Caen 1968

Revue d'Immunologie, Paris, tome **32**, 1968, n° 3, pp. 105 à 150.

MÉMOIRES ORIGINAUX

Études sur un antigène somatique isolé d'une souche de *B. Subtilis* (*)

par

P. LALLOUETTE

En 1953, nous rapportions nos essais de bactériothérapie de la tuberculose expérimentale à l'aide de souches de *Bacillus* et de *Plectridium*. Ces germes, administrés par voie orale ou parentérale, provoquaient un retard significatif de l'évolution de la tuberculose du cobaye (11).

En 1961, nous avions montré que cette activité était liée à la stimulation non spécifique de processus de défense entraînant une modification du « substrat animal ». Des observations particulièrement suggestives avaient été faites chez la souris au moyen d'une souche de *Bacillus subtilis*. Son administration par voie intrapéritonéale permettait d'obtenir, chez les animaux traités, une résistance très accrue envers des infections expérimentales provoquées par diverses variétés pathogènes pour cette espèce : *Pasteurella septica*, *Streptococcus hemolyticus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (10).

En 1964, avec R. Richou et Cl. Quinchon, nous avons étudié les antigènes de cette souche (*Bacillus subtilis* L) en comparaison avec ceux d'autres *Bacillus*. Entre les divers clones étudiés, certaines parentés antigéniques, soit de type somatique, soit de type flagellaire, soit les deux à la fois, ont été mises en évidence (22).

Nous rapportons dans le présent travail les études (**) que nous avons consacrées à la souche de *Bacillus subtilis* L et à l'antigène somatique que nous en avons extrait. Notre travail comprend quatre parties :

1° Étude du pouvoir pathogène de la souche L.

(*) Mémoire faisant partie des travaux présentés pour la soutenance d'une thèse de Doctorat ès Sciences, enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro A.O. 2.222.
Chaire de Microbiologie — Faculté des Sciences de Caen — Prof. J. Jacquet.

(**) La bibliographie concernant ces sujets sera rapportée par ailleurs.

2° Extraction de l'antigène somatique. Propriétés biochimiques.
3° Étude de l'activité expérimentale de l'antigène.
4° Étude du mécanisme d'action de l'antigène.

I. — ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGÈNE DE LA SOUCHE DE *BACILLUS SUBTILIS* L.

Le *Bacillus subtilis* L a été isolé d'une culture de mycobactérie contaminée accidentellement. Cette souche est conservée sous forme lyophilisée et sur sable stérile à la température du laboratoire.

Les caractères bactériologiques, biochimiques et immunologiques en ont été antérieurement rapportés (22).

Les cultures ont été effectuées sur les milieux usuels. Tous les milieux à base de peptone conviennent à la croissance de ce germe qui ne peut utiliser l'azote sous forme minérale. Afin d'inoculer des suspensions homogènes, nous avons utilisé des cultures submergées.

L'étude du pouvoir pathogène a été réalisée sur souris, rats, cobayes et lapins, par inoculation unique ou par réinoculation.

1° *Inoculation unique*

a) *Souris :* 50 souris R.A.P. de 20 g ± 1 g ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 1 ml de bouillon de culture aérée âgée de 24 heures. Les animaux ont été observés pendant un mois : aucune souris inoculée n'est morte durant cette période.

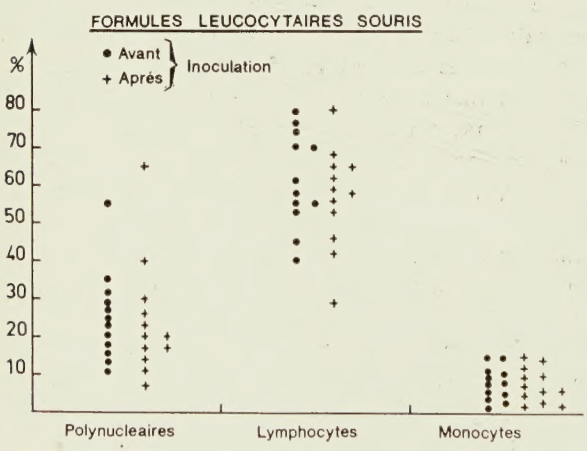

FIG. 1.

Des formules leucocytaires ont été pratiquées avant et après inoculation sur 24 animaux et ne montrent aucune différence entre les deux contrôles effectués. Les résultats sont récapitulésdans la figure n° 1.

b) *Rats :* 10 rats Wistar de 150 g ± 10 g ont reçu 2 ml de culture microbienne par voie intrapéritonéale. Aucun des animaux n'a présenté de symptôme pathologique.

c) *Cobayes :* 5 cobayes tricolores d'un poids moyen de 350 g ont reçu 2 ml et 5 cobayes de même poids 5 ml de bouillon de culture par voie intrapéritonéale, sans que l'on ait noté de mortalité après une observation de plusieurs semaines.

UNIV. LEIDEN BIBL.

d) *Lapins :* 10 lapins de race fauve d'un poids moyen de 2 kg ont reçu, par voie intraveineuse, selon les animaux, de 1 à 5 ml de culture du germe. Aucun symptôme pathologique n'a été observé.

2° *Réinoculations*

a) *Rats :* 10 rats Wistar de 150 g ± 10 g ont reçu, pendant une période de 8 mois, 2 inoculations par semaine de 0,5 ml par voie intrapéritonéale. Tous les animaux ont survécu après 66 injections et aucune modification significative n'a été notée sur leur courbe de poids.

b) *Cobayes :* 30 cobayes tricolores, de 350 g ± 20 g au début de l'expérience, ont reçu 1 ml de la culture de *Bacillus*, par voie intrapéritonéale, deux fois par

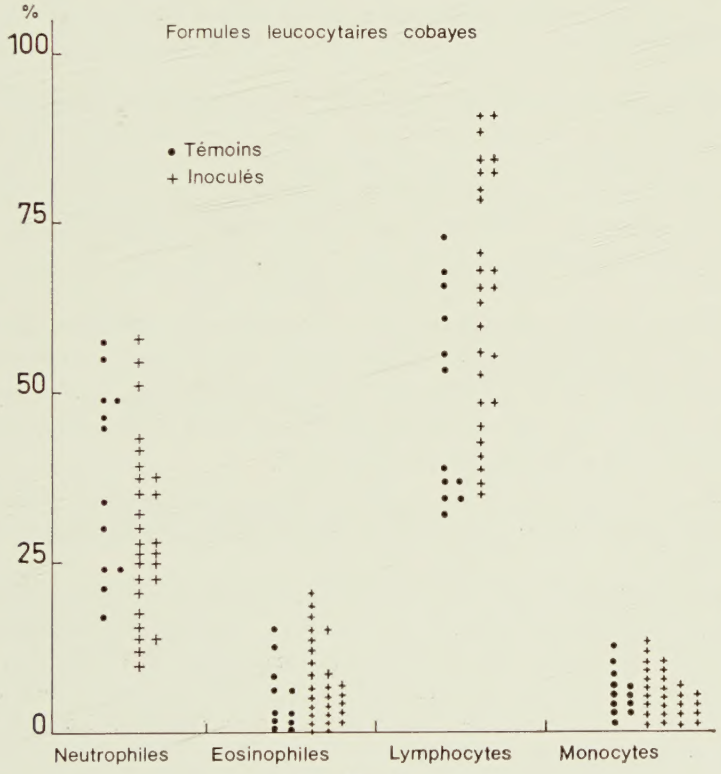

Fig. 2.

semaine pendant 10 mois. Trois animaux sont morts accidentellement dans le cours de ces essais, mais aucun symptôme pathologique n'a été noté sur les animaux survivants.

Des numérations et des formules leucocytaires ont été pratiquées sur les animaux en fin d'expérience et sont rapportées dans le tableau I et la figure n° 2.

TABLEAU I

Groupes	Nombre d'animaux	Numération leucocytaire (moyenne du groupe)
Témoins	15	11 500
Inoculés	27	14 300

Chez les animaux inoculés on note une leucocytose augmentée de 25 p. 100 par rapport aux témoins, ainsi qu'une hyperlymphocytose sur 9 des 27 animaux.

Il est possible de conclure de l'ensemble de ces essais à la virulence et à la toxicité pratiquement nulles de la souche de *Bacillus subtilis* L.

II. — EXTRACTION DE L'ANTIGÈNE SOMATIQUE THERMOSTABLE

Nous avons effectué nos essais d'extraction de l'antigène somatique en contrôlant l'activité de nos fractions au moyen d'un anti-sérum préparé selon la méthode dérivée de celle que nous avions antérieurement utilisée (22).

1° *Préparation de l'antisérum*

Animaux d'expérience. — Lapins mâles ou femelles non gestantes de 1,5 à 2 kg.

Antigène. — Suspension dans l'eau physiologique de la purée microbienne recueillie par centrifugation à partir d'une culture submergée de 48 heures à 30°.

La suspension est étalonnée à 80 divisions avec le photomètre tri-cellule Jobin et Yvon écran 55, puis chauffée 30 minutes à 120°.

Conditions expérimentales. — Un prélèvement de sang est effectué par ponction cardiaque, avant toute injection, sur chaque animal, afin de vérifier l'absence d'agglutinines naturelles.

Une série de 8 injections de 1 ml de suspension microbienne est effectuée à raison d'une inoculation tous les 3 à 4 jours. Un mois après la dernière inoculation, on effectue une série de 4 injections de rappel de 1 ml, également tous les 3 à 4 jours. Dix jours après la dernière injection, la totalité du sang est recueillie par prélèvement carotidien.

Titrage des agglutinines. — Le titrage s'effectue en utilisant des quantités fixes d'antigène et variables de sérum.

2° *Culture du germe*

Matériel. — Bouteilles Pyrex de 10 litres contenant 8 litres de milieu de culture. Aération assurée au sein du milieu de culture au moyen d'une canne en verre passant au travers du coton cardé qui sert à boucher les flacons. La canne de verre est raccor-

dée à un filtre métallique contenant du coton cardé. L'ensemble flacon-canne-filtre est stérilisé solidairement à l'autoclave. Le raccordement est effectué à la source d'air comprimé après ensemencement.

Milieu de culture. — A la suite de nombreux essais, nous utilisons le milieu suivant qui permet d'obtenir une récolte abondante :

— Peptone pancréatique . . . . . 10 g
— Saccharose. . . . . 10 g
— Huile d'arachide . . . . . 0,2 ml (anti-mousse)
— Eau du robinet filtrée sur charbon activé (*) . . . . . q.s.p. 1000 ml

Stérilisation 30 minutes à 120 °C.

Le milieu est réparti à raison de 8 litres par flacon Pyrex de 10 litres.

Ensemencement. — A partir de la souche conservée sur sable stérile, un premier repiquage est effectué sur gélose nutritive. Après 24 heures à 30 °C, cette culture est utilisée pour ensemencer autant de nouvelles géloses qu'il est nécessaire, lesquelles après 48 heures à l'étuve à 30 °C, sont utilisées pour l'ensemencement des ballons de culture.

Une suspension dans l'eau physiologique stérile est obtenue par grattage au fil de platine des colonies sur la gélose (10 ml par tube de culture); 2 à 5 ml de cette suspension sont utilisés pour l'ensemencement de chaque flacon.

L'aération est maintenue pendant tout le cours de la culture à raison de 8 litres d'air par minute pour 8 litres de milieu de culture.

La culture est poursuivie pendant 36 à 48 heures à 30 °C. La croissance est vérifiée par turbidimétrie. Lorsque le développement atteint le degré désiré, un examen microscopique et une agglutination avec l'antisérum sont pratiqués. Le premier permet de vérifier l'absence de contamination ou de souffrance du germe (filamentation, granulations, modification d'affinités tinctoriales). L'agglutination pratiquée avec l'antisérum donne un titre voisin de 1/800.

3° *Obtention de la poudre microbienne*

Les germes sont séparés du milieu de culture au moyen d'une centrifugeuse type Sharpless à bol séparateur, à 33 000 g et recueillis sur un papier paraffiné.

Ce culot microbien est mis en suspension dans 20 fois son volume d'acétone à + 4° C pendant 24 heures en agitant fréquemment. Après séparation, les corps microbiens sont traités par 10 fois leur volume d'éther éthylique à + 4 °C pendant 24 heures. Cette opération permet de tuer les cellules (**) et d'obtenir la délipidation des corps microbiens. Après séchage sous vide, on obtient une poudre beige clair qui se conserve plusieurs années à la température du laboratoire. Un litre de milieu de culture fournit environ 1 g de poudre microbienne délipidée.

(*) Indispensable pour éliminer les antiseptiques chlorés présents dans l'eau de notre laboratoire.
(**) On vérifie, par répartition sur gélose nutritive en boîte de Pétri, l'efficacité de cette opération (1 mg/ml de poudre microbienne).

C'est à partir de cette poudre que nous avons réalisé nos essais d'extraction de l'antigène somatique.

4° *Lyse enzymatique*

La délipidation rend les corps microbiens sensibles à l'action du lysozyme et des enzymes protéolytiques sans altération de l'activité de l'antigène.

Nous avons donc effectué une série d'essais portant sur :

a) l'action du lysozyme seul en fonction du temps et de la concentration.

b) l'action des enzymes protéolytiques seules en fonction du temps et de la concentration.

c) l'action combinée en deux temps successifs du lysozyme, puis des enzymes protéolytiques.

Matériel et Méthode

— Chlorhydrate de lysozyme cristallisé (laboratoire I.B.F. lot FF 1099);

— Enzymes protéolytiques;

— trypsine (laboratoire I.B.F. 3.150 NF unités/mg);

— alpha-chymotrypsine Armour (laboratoire I.B.F. 1.100 U.I/mg);

— protéase fongique extraite d'une souche d'*Aspergillus flavus* non toxigène selon la méthode que nous avons antérieurement rapportée et titrant 4.400 U/mg (12) (14).

La poudre microbienne délipidée est mise en suspension dans l'eau distillée à raison de 10 mg/ml; la suspension est homogénéisée pendant 60 minutes à 37 °C, par agitation magnétique ou à l'aide d'un homogénéiseur.

Une mesure turbidimétrique est effectuée (elle correspond à 100 degrés du photomètre tricellule Jobin et Yvon écran 55). Le lysozyme ou l'enzyme protéolytique sont introduits dans la suspension afin d'obtenir la concentration souhaitée par ml de mélange. Le pH est ajusté à 7.

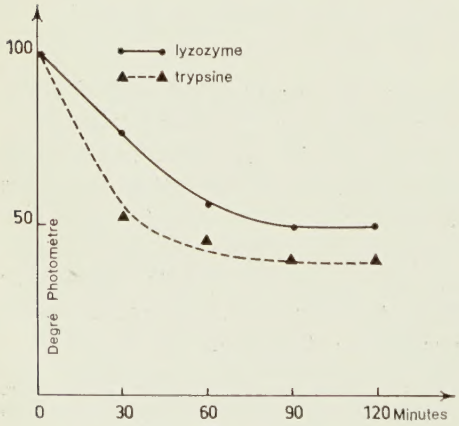

Fig. 3.

Comme il s'agit, dans les deux cas, de réaction enzymatique, celle-ci est fonction de la température, de la concentration relative en enzyme et en substrat, et du temps. Il est donc possible d'agir sur ces trois facteurs pour obtenir le résultat désiré qui est la lyse la plus complète possible sans altération de l'antigène recherché. Nous avons retenu la température de 37 °C et les temps d'action de 60 minutes.

Dans ces conditions, nous avons fait varier les quantités respectives d'enzymes et de substrat pour obtenir l'effet optimal. Sur 10 mg/ml de poudre microbienne, l'activité la meilleure a été obtenue pour le lysozyme, avec 80 µg/ml et pour les enzymes protéolytiques également avec 80 µg/ml. La figure n° 3 montre la réduction de l'opacité de la suspension microbienne en fonction du temps pour ces concentrations et confirme la limitation du phénomène à un état d'équilibre.

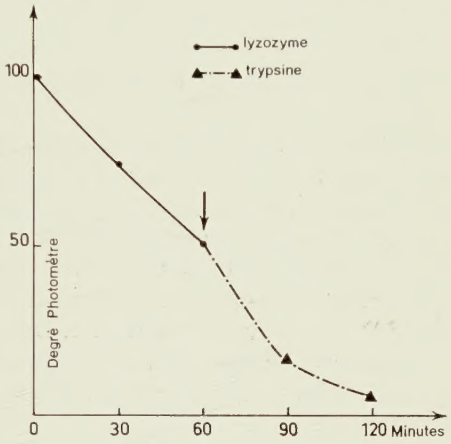

FIG. 4.

Nous avons alors utilisé les enzymes l'une après l'autre et constaté l'addition des deux mécanismes sans interférence de l'un sur l'autre. On obtient, ainsi, par action sur des substrats différents des constituants du corps microbien une réduction de plus de 90 p. 100 de l'opacité de la solution par lyse des cellules bactériennes.

La figure n° 4 objective le phénomène pour des concentrations identiques à celles utilisées dans la précédente expérience.

La figure n° 5 indique la possibilité d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre des enzymes protéolytiques. Après combinaisons diverses, nous avons abouti à l'emploi d'une suspension de poudre microbienne brute à 10 mg/ml, de 80 µg/ml de lysozyme pendant 60 minutes, puis de 80 µg/ml de trypsine pendant 60 minutes. Nous obtenons ainsi, une réduction d'opacité de plus de 90 p. 100. La suspension est ensuite chauffée 15 minutes à 115 °C pour détruite les enzymes (*) puis dialysée pendant 24 heures contre l'eau courante. Le contenu du sac de dialyse est lyophilisé. Cette fraction sera dénommée F.S.B.S. (fraction somatique du *Bacillus subtilis*) dans la suite de ce travail.

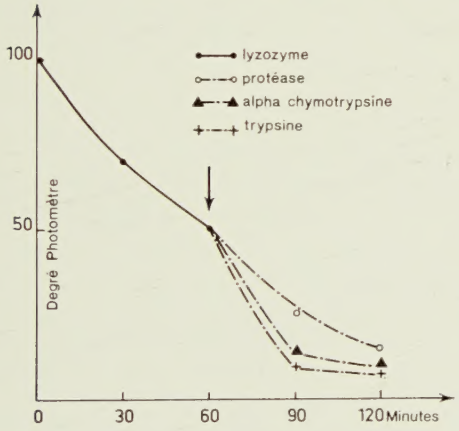

FIG. 5.

La fraction S.B.S. contient l'activité antigénique et permet d'en étudier certaines propriétés :

a) l'antigène forme dans l'eau et dans les tampons dilués une solution colloïdale qui se dépose très lentement. Il est insoluble dans les solvants organiques mais soluble en totalité dans le phénol à 65 °C ou dans le phénol liquide officinal.

(*) Cette destruction est vérifiée pour le lysozyme sur *Micrococcus lysodeikticus* et pour les enzymes protéolytiques par la méthode caséinolytique (14).

b) l'antigène ne se fixe pas sur les résines échangeuses de cation de type carboxylique (IR 50) ou de type sulfonique (IR 120) en cycle H; il se fixe faiblement sur les résines échangeuses d'anion fort type IR 400 en pH acide, en cycle OH.

c) l'antigène est précipité par les cations divalents.

5° *Purification de l'antigène somatique*

Cette purification est effectuée en tenant compte de deux des propriétés de l'antigène : solubilité dans le phénol, insolubilité dans les solvants. La F.S.B.S. lyophilisée est reprise par le phénol liquide officinal à raison de 2 g pour 50 ml. Cette solution, très légèrement opalescente, est filtrée puis précipitée par l'éther éthylique exempt de péroxydes à raison de 1 volume de solution phénolique pour 2 volumes d'éther. Après quelques minutes, un précipité se forme; ce précipité est recueilli par centrifugation à 2.000 tours/min. Le précipité est lavé plusieurs fois par l'éther afin d'éliminer le phénol, puis séché sous vide.

L'ensemble des opérations est récapitulé dans le schéma suivant :

Culture submergée — 30° C — 24 heures
↓
Centrifugation Sharpless
↓
Acétone 20 volumes — 4° C — 24 heures
↓
Éther 10 volumes — 4° C — 24 heures
↓
Poudre microbienne délipidée
↓
Lysozyme — 60 minutes — 37° C
↓
Trypsine — 60 minutes — 37° C
↓
Chauffage — 15 minutes — 115° C
↓
Dialyse — 24 heures contre l'eau courante
↓
Fraction S.B.S.
↓
Solubilisation dans phénol liquide
↘ par l'éther éthylique
↓
Lavage et séchage.

6° *Propriétés de l'antigène somatique*

a) Propriétés biochimiques

Après lyophilisation, l'antigène somatique du *Bacillus* se présente sous forme d'une poudre blanche qui forme dans l'eau distillée ou l'eau physiologique une solution colloïdale opalescente. L'antigène, plus soluble en milieu alcalin qu'en milieu acide,

insoluble dans les solvants organiques, est soluble dans le phénol à chaud et dans le phénol liquide à froid.

Il est classiquement admis que les fractions microbiennes solubles dans le phénol sont des protéines ou des glycoprotéines. L'antigène somatique n'est pas précipitable par l'acide perchlorique; en revanche, il est précipitable par l'acide phosphotungstique. Ces propriétés sont celles de certaines glycoprotéines et constituent notamment un procédé d'extraction des muco-protéines du sérum (précipitation par l'acide phosphotungstique après défécation par l'acide perchlorique).

Le précipité obtenu par l'acide phospho-tungstique dans l'acide chlorhydrique 2N contient des protéines et des polysaccharides :

A 10 ml d'une solution à 3 mg/ml d'antigène somatique, on ajoute 4 ml du réactif phospho-tungstique à 5 p. 100. Après 10 minutes à la température du laboratoire le précipité est recueilli par centrifugation.

Les protéines sont dosées par la méthode du Biuret par rapport à l'albumine bovine cristallisée, donc exprimées en équivalence.

Un contrôle est effectué avec le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de titrage des protéines indiquée par Loiseleur (18).

La partie saccharidique est titrée par la méthode de l'anthrone (3) (technique de Goa modifiée). Les chiffres obtenus sont rapportés à un témoin glucose.

L'ensemble de l'étude biochimique sera publié séparément.

Par ailleurs, nous avons toujours observé un parallélisme constant, dans les domaines expérimentaux que nous avons explorés entre l'activité de la fraction S.B.S. et celle de l'antigène somatique. De ce fait, nous avons pu rapporter à l'antigène somatique la totalité des activités que nous avions objectivées au niveau de la fraction S.B.S.

b) Activité antigénique *in vitro*

L'activité antigénique titrée envers l'anti-sérum préparé avec les corps microbiens chauffés n'est pas influencée par un chauffage effectué pendant 5 heures à 120 °C, ni par l'alcool à 96° ou par l'acétone, à la température du laboratoire, ni par le formol à 5 p. 1000 pendant 20 jours à 37 °C. L'activité antigénique est peu influencée par l'acide acétique, mais est altérée par l'acide phosphotungstique et l'acide trichloracétique. L'activité est détruite par l'alcalinité au-dessus de pH 10. Par le procédé des inhibitions spécifiques, il a été observé que l'agglutination n'était pas modifiée par le maltose, le mannose, le ribose, le glucose, le raffinose, le galactose; toutefois, il existe une nette inhibition par le dextran.

Le fait de cette inhibition prouve le rôle antigénique de la partie polysaccharidique et sans doute celui d'un déterminant de même configuration que le dextran.

c) Activité antigénique *in vivo*

Nous avons étudié chez le lapin l'activité antigénique propre de l'antigène somatique par voie intraveineuse et sous-cutanée.

Voie intraveineuse. — Les essais ont été réalisés sur des lots de 4 animaux de 1,5 à 2 kg, dépourvus d'immunité naturelle (*).

L'antigène est mis en suspension dans l'eau physiologique, à raison de 0,8 p. 1000. Huit injections de 1 ml sont pratiquées par voie intraveineuse à 3-4 jours d'intervalle. Un mois après la dernière injection, 4 injections de rappel sont faites dans les mêmes conditions.

Dix jours après la dernière injection, le sang est prélevé à la carotide et titré vis-à-vis de l'antigène.

Dans le tableau II, figurent les résultats des essais réalisés avec 3 préparations antigéniques différentes et correspondant aux 3 lots d'antisérum obtenus avec chacune.

TABLEAU II

Antigène 0,8 p. 1000 pH7	Sérum anti-		
	SH_1	SH_2	SH_3
SH_1	1/320	1/640	1/320
SH_2	1/320	1/640	1/320
SH_3	1/320	1/640	1/320

L'examen de ce tableau montre l'identité des trois préparations antigéniques, donc la bonne reproductibilité des essais d'extraction de l'antigène. Par ailleurs le lot de lapins recevant l'antigène SH_2 s'est montré meilleur producteur d'anticorps que les 2 autres lots.

Voie sous-cutanée. — Quatre lapins reçoivent sous la peau, à 4 jours d'intervalle, 5 injections de 1, 2, 3, 4 et 5 ml de l'antigène (10 mg/ml) additionné ou non de 2 p. 100 d'alun de potassium. Le sang des animaux est prélevé 10 jours après la dernière injection d'antigène. Le titre des agglutinines a été trouvé égal au 1/500.

La voie sous-cutanée est donc utilisable pour l'obtention d'un titre élevé d'agglutinines. L'alun de potassium, adjuvant classique, n'augmente pas le titre des sérums.

Des essais avec d'autres adjuvants sont actuellement en cours.

Dans certains cas, nous avons constaté que la lecture était malaisée; aussi avons-nous utilisé des adjuvants d'agglutination tels les hématies ou les globules de latex :

Hémagglutination. — Les hématies de mouton sont lavées trois fois avec de l'eau physiologique et incubées volume à volume avec la suspension antigénique, 2 heures à 37 °C. Les hématies ainsi préparées sont centrifugées, lavées et diluées à 2,5 p. 100.

Le sérum est inactivé 30 minutes à 56 °C puis incubé 2 heures à 37° avec des

(*) Celle-ci est exceptionnelle, du fait du caractère non pathogène de la souche, mais nous l'avons trouvée quelquefois. Ceci indique qu'il existe vraisemblablement des antigènes croisés avec des souches réactogènes pour le lapin.

hématies de mouton fraiches, centrifugé et réparti dans des tubes à hémolyse à raison de 0,5 ml (dilutions successives au 1 /2).

Dans chaque tube, on répartit 0,5 ml de la suspension d'hématies. Le titre d'hémagglutination est lu après 2 heures à 37 °C. Les résultats de 2 essais figurent au tableau III. Les hématies tannées ne sont pas utilisables dans les mêmes conditions.

Globules de latex. — Un volume de globules de latex (type Bacto-Latex 0,81 Difco) est incubé 24 heures à + 4 °C avec 2 volumes de la suspension d'antigène somatique titrant 0,8 mg /ml.

Le sérum est réparti dans des tubes à hémolyse à raison de 1 ml (dilutions successives au 1 /2). Dans chaque tube, ainsi que dans un tube témoin contenant 1 ml d'eau physiologique, on ajoute 1 goutte du mélange antigénique. Les tubes sont agités, bouchés et portés 3 heures à 37 °C. L'agglutination est lue après une nuit à la température du laboratoire. Les résultats de 2 essais figurent au tableau III.

TABLEAU III

Lots (*)	Hématies	Latex
SH_1	1 /320	1 /1280
SH_6	1 /320	1 /1280

(*) Sérum anti-SH_1 décomplémenté pour l'hémagglutination.

La manipulation et la conservation des globules de latex sont plus aisées que celles des hématies et l'augmentation de sensibilité est plus grande. Nous avons donc utilisé cette méthode dans nos études ultérieures, après vérification que l'antisérum, n'agglutinait pas les globules de latex (facteur « rhumatoïde »).

d) Comparaison avec les antigènes de la souche

Les antisérums préparés pour l'étude des antigènes de la souche ont été utilisés pour l'étude de l'antigène somatique et les antisérums préparés avec l'antigène

TABLEAU IV

Antigène	Sérum anti-		
	Souche vivante	Souche chauffée	Antigène somatique
Souche vivante	1 /10 000	1 /1 280	1 /320
Souche chauffée	1 /1 280	1 /640	1 /320
Antigène somatique . .	1 /160	1 /320	1 /320

somatique ont été étudiés envers la souche vivante et envers la souche tuée par la chaleur. Les résultats sont rapportés dans le tableau IV.

L'examen de ce tableau montre l'excellente extraction de l'antigène somatique. Il semble, toutefois, que l'antigène extrait, aux erreurs expérimentales de lecture près, ne correspond pas à la totalité de l'activité antigénique thermostable de la souche, fait peut-être lié à la perte, dans le cours de l'extraction, d'un facteur adjuvant de l'activité antigénique.

7° *Étude de la toxicité* (*)

Matériel et méthode :

Souris Swiss, poids moyen 20 g ± 1.
Rats Wistar, poids moyen 200 g ± 15.
Lapins de 2 kg.
Cobayes tricolores poids moyen 350 g.

L'antigène lyophilisé a été administré en solution aqueuse. L'administration orale a été pratiquée à la sonde œsophagienne.

A. — Toxicité aigue

a) Souris. — *Voie orale.* — A 4 lots de 10 animaux, nous avons administré en une fois des doses correspondant, selon les lots, à 0,5; 1,25; 2,5; 5,0 g/k. Aucun des animaux n'a présenté la moindre manifestation pathologique après 10 jours d'observation.

Voie intrapéritonéale. — Recherche de la D.L. 50 par la méthode des probits, sur 3 groupes de 20 souris réparties par tirage au sort. L'analyse probit maximum de vraisemblance réalisée à partir des données expérimentales a permis d'évaluer la D.L. 50 à 2 g/k à l'intervalle de confiance de 5 p. 100.

b) Rats : *Voie intrapéritonéale.* — A 4 lots de 10 rats, nous avons administré en une seule fois, par voie intrapéritonéale, des doses correspondant selon les lots à 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 g/k. Comme chez la souris, la D.L. 50 est voisine de 2 g/k.

B. — Toxicité chronique a court terme

Souris : *Voie orale.* — Un lot de 20 animaux a reçu 20 prises journalières de 25 mg d'antigène *per os*, soit un total de 500 mg par animal. Après observation pendant deux mois il n'est constaté aucune mortalité ni symptôme pathologique.

Voie intrapéritonéale. — Les essais portent sur un groupe de 40 animaux qui reçoivent 80 mg d'antigène par animal en 12 injections réparties sur un mois, les animaux témoins recevant, dans les mêmes conditions, des injections d'eau physiolo-

(*) Ces essais ont été réalisés en collaboration avec M. L. Dhennin et ses collaborateurs du Service des Virus du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort.

gique. Deux animaux sont morts dans le groupe témoin et le groupe traité. Aucune modification de la courbe de poids n'a été notée dans les 2 groupes.

C. — Toxicité chronique par voie intramusculaire

a) Lapins : Après tirage au sort, 18 lapins sont répartis en 3 groupes : deux groupes de 7 animaux pour les injections d'épreuve et un groupe de 4 animaux servant de témoins.

1er groupe : les animaux reçoivent 25 injections intra-musculaires alternées cuisse droite cuisse gauche, à raison de deux injections hebdomadaires, sous le volume de 2 ml pour un total de 0,40 g d'antigène par animal.

2e groupe : dans les mêmes conditions que la première série, les animaux reçoivent un total de 1,20 g d'antigène par animal.

3e groupe : les animaux reçoivent 25 injections intramusculaires de 2 ml d'eau physiologique.

Les animaux sont pesés régulièrement chaque semaine. En fin d'expérience il est procédé sur tous les sujets à un étalement de sang pour la détermination de la formule leucocytaire.

Quinze jours après la dernière injection, la moitié des animaux de chaque lot a été sacrifiée par exsanguination et des prélèvements de foie, de rate et de rein ont été effectués sur chaque animal en vue d'examens histologiques. Après un délai de 3 semaines, il est opéré de la même façon sur les animaux restants.

Résultats. — Les injections ont été parfaitement tolérées dans les 3 séries. Aucune réaction locale ou générale n'a été observée.

— La croissance s'est poursuivie de façon semblable dans les 3 séries.

— Les moyennes effectuées sur les formules leucocytaires montrent une diminution des polynucléaires neutrophiles et une augmentation des lymphocytes (tabl. V).

— Des radiographies pratiquées sur un animal par lot ne montrent pas de lésion osseuse.

TABLEAU V

Formule	1re série	2e série	Témoins
Polynucléaires			
Neutrophiles	29,70	39,10	54,00
Éosinophiles	0,40	1,20	0,75
Basophiles	2,80	2,60	2,60
Lymphocytes	55,00	46,80	29,30
Monocytes	9,80	9,40	11,75
Cellules jeunes	1,50	0,80	0,60
Cellules non identifiées	0,80	0,40	1,00

Les chiffres expriment la moyenne arithmétique pour chaque lot

— Les poids du foie, de la rate et du poumon ont été relevés, leur comparaison ne montre aucune différence significative.

— Les examens histopathologiques sur des échantillons de foie, rate, et rein, n'ont montré aucune différence significative entre les animaux témoins et traités. Toutefois, sur les reins de 2 lapins traités à forte dose, des lésions de vacuolisation et de desquamation épithéliales, au niveau des pyramides de Ferrein, ont été observées dans des zones réduites.

b) Cobayes : Après tirage au sort, 101 cobayes sont répartis en 3 groupes. Un premier groupe est composé de 21 femelles et de 20 mâles; le deuxième groupe de 20 mâles; le troisième groupe de 20 femelles et de 2 sous-groupes de 10 mâles.

1er groupe: les animaux reçoivent 24 injections intramusculaires alternées cuisse droite et cuisse gauche, à raison de 2 injections hebdomadaires, sous le volume de 1 ml pour un total de 0,24 g d'antigène par animal.

2e groupe : dans les mêmes conditions, les animaux ont reçu 1,44 g d'antigène par animal en 24 injections intramusculaires sous le volume de 2 ml par injection.

3e groupe : 20 femelles et 10 mâles reçoivent 24 injections intramusculaires de 1 ml d'eau physiologique; 10 mâles 24 injections de 2 ml. Ce groupe sert de témoin aux 2 groupes précédents.

Les animaux ont été pesés régulièrement chaque semaine et gardés en observation 4 mois après la dernière injection afin d'examiner leur courbe de poids. La semaine précédant la première injection, un prélèvement de sang a été effectué, ainsi que la semaine suivant la dernière injection, en vue d'un examen hématologique.

Résultats. — Les injections, tant chez les animaux traités que chez les témoins, ont déterminé des réactions inflammatoires locales: les lésions ont disparu sans séquelle. Aucune réaction générale n'a été notée.

La croissance s'est poursuivie de façon semblable dans les 3 séries, pendant le traitement et à la fin de celui-ci. Poids moyen 350 g au début et 800 g en fin d'expérience.

— Les moyennes des numérations leucocytaires de chaque groupe, en début

TABLEAU VI

Lot	Neutrophiles		Basophiles		Éosinophiles		Lymphocytes		Monocytes	
	Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin
Témoins femelles . .	48,70	54,80	0,45	0,20	8,00	7,20	41,45	35,90	1,40	1,90
Témoins mâles . . .	59,80	60,40	0,60	0,20	11,80	1,60	27,60	33,00	0,20	4,80
Traités femelles . . .	58,25	55,00	0	0,10	8,40	2,90	32,60	40,00	0,75	2,00
Traités mâles 1 ml .	49,30	49,80	0,50	0,30	7,30	1,20	42,30	45,20	0,60	3,50
Traités mâles 2 ml .	53,00	50,00	0,30	0,30	6,70	0,50	39,30	45,60	0,70	3,60

Les chiffres expriment la moyenne arithmétique pour chaque lot.

et en fin d'expérience, ne montrent pas de différence significative entre les animaux témoins et les animaux traités (tab. VI), bien que les doses administrées aient été proportionnellement plus importantes chez les cobayes que chez les lapins.

Les toxicités aiguë et chronique de l'antigène sont donc très faibles. Il est à noter que lors d'administration prolongée cet antigène ne provoque pas d'hyperplasie du système réticulo-endothélial.

8° *Réactions de sensibilisation*

Nous avons étudié le rôle de l'antigène dans trois types de réactions de sensibilisation :

a) essai de sensibilisation anaphylactique.

b) essai d'obtention du phénomène de Schwartzmann.

c) essai de sensibilisation de type retardé.

A. — Essai de sensibilisation anaphylactique

Les essais ont été réalisés sur des lots de 8 cobayes de poids compris entre 350 et 400 g.

Un premier lot a reçu par voie intrapéritonéale une injection de 10 mg d'ovalbumine sous le volume de 1 ml; un second lot recevait par la même voie et sous le même volume 10 mg d'antigène.

L'injection déclenchante a été effectuée 8 jours après l'injection préparante, par voie intrapéritonéale, sous le volume de 2 ml titrant 20 mg/ml pour chacune des deux substances. A titre de contrôle, 2 animaux de chaque groupe ont été éprouvés avec la substance utilisée dans l'autre groupe. Le tableau VII rend compte de l'expérience.

TABLEAU VII

Injection préparante	Injection déclenchante	Résultats
Ovalbumine	Ovalbumine	Choc anaphylactique +++(*)
	Antigène	0
Antigène	Ovalbumine	0
	Antigène	0

(*) Chez tous les animaux.

L'examen de ce tableau montre que l'antigène n'est pas sensibilisant dans les conditions expérimentales.

B. — Phénomène de Schwartzmann local

Nous avons vérifié si cette fraction donnait lieu au phénomène de Schwartzmann. Nous avons donc étudié l'antigène en comparaison avec un filtrat de culture d'*Escherichia coli* 111 B4 âgée de 24 heures sur bouillon nutritif. Nous avons effectué les essais avec la substance homologue et la substance croisée.

Les essais ont été effectués sur des lots de 6 lapins, de poids 1500-1700 g, de sexe mâle.

TABLEAU VIII

Injection préparante	Injection déclenchante	Résultat
Escherichia coli 111 B4	*Escherichia coli* 111 B4	3 h = +++ 24 h = ulcération (*)
	Antigène somatique	3 h = + - 24 h = résorption (*)
Antigène somatique	Antigène somatique	3 h = légère réaction (*) 24 h = 0
	Escherichia coli 111 B4	3 h = légère réaction (*) 24 h = 0

(*) Pour tous les animaux.

Le 1er lot a reçu par voie intradermique une inoculation de 1 ml de la culture d'*Escherichia coli ;* le second lot a reçu par la même voie et sous le même volume 1 mg d'antigène. 24 heures plus tard, chacun des 2 lots a été divisé en 2 groupes de 3 animaux, et chacun de ces groupes a été éprouvé par une inoculation intraveineuse, soit de 1 ml du filtrat de culture d'*Escherichia coli* 111 B4, soit de 1 mg d'antigène. Le tableau VIII rend compte du résultat de l'expérience, où le nombre de croix indique l'intensité de la réaction.

L'examen de ce tableau montre que l'antigène somatique n'est pas actif en tant qu'agent sensibilisant, alors qu'il manifeste une légère activité chez l'animal sensibilisé par *Escherichia coli*. Cette sensibilisation est faible, puisqu'elle ne conduit qu'à une réaction immédiate sans évolution vers l'ulcération classique ainsi que l'on peut le constater chez les animaux préparés et éprouvés avec *Escherichia coli*.

C. — Essai de sensibilisation de type retardé

Nous avons effectué 2 types d'essais différents : l'un sur cobaye tuberculeux et l'autre sur cobaye préparé par l'antigène. Dans les 2 cas, l'antigène a été étudié comme substance d'épreuve, en comparaison avec la réaction provoquée par les mycobactéries ou la tuberculine. Ces essais ont été effectués sur cobayes tricolores de poids moyen 350 g :

a) un lot de 9 animaux a été inoculé par voie sous-cutanée dorsale avec 1 ml d'une suspension d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis* H 37 RV cultivée pendant 8 jours sur milieu de Dubos et diluée au 1/2.

b) un lot de 6 animaux a été injecté par voie sous-cutanée avec 1 mg d'antigène sous le volume de 1 ml.

c) un lot de 6 animaux a été injecté par voie intra-péritonéale avec 1 mg d'antigène sous le volume de 1 ml.

Trois semaines plus tard, les animaux ont été éprouvés de la façon suivante :

a) les animaux inoculés avec la souche H 37 RV ont reçu :

— 3 animaux, par voie intra-dermique, 1 ml d'une suspension de H 37 RV semblable à l'inoculum préparant;

— 3 animaux, par voie sous-cutanée, 0,3 ml de tuberculine brute (Institut Pasteur de Paris) diluée au 1/10;

— 3 animaux, par voie sous-cutanée, 1 mg d'antigène sous le volume de 1 ml.

b) les animaux injectés avec l'antigène par voie sous-cutanée ont reçu :

— 2 animaux, sous le volume de 1 ml, 1 mg d'antigène par voie intradermique;

2 animaux, sous le volume de 1 ml, 1 mg d'antigène par voie sous-cutanée;

— 2 animaux, 0,3 ml de tuberculine brute dans les mêmes conditions que le groupe H 37 RV.

c) les animaux injectés avec l'antigène par voie intrapéritonéale ont reçu :

— 3 animaux, 1 mg d'antigène sous le volume de 1 ml par voie sous-cutanée.

— 3 animaux, la même suspension par voie intrapéritonéale.

Le tableau IX indique les résultats observés.

L'antigène ne provoque donc pas chez le cobaye de réaction d'hypersensibilité de type retardé (*).

TABLEAU IX

Injection préparante	Injection déclenchante	Résultat
H 37 RV — par voie sous-cutanée.	H 37 RV — intradermique Tuberculine sous-cutanée Antigène sous-cutané	Phénomène de Koch Mort des animaux 0
Antigène par voie sous-cutanée.	Antigène sous-cutané Antigène intra-péritonéal Tuberculine sous-cutanée	0 0 0
Antigène par voie intra-dermique	Antigène sous-cutané Antigène intra-péritonéal	0 0

9° *Antigène de Forssman*

Nous avons recherché si notre antigène somatique de Bacillus n'était pas un antigène de Forssman. Nous avons utilisé des lapins après avoir vérifié que leur sérum ne contenait pas d'agglutinines envers les hématies de mouton.

Nous avons injecté deux lapins avec des hématies humaines du groupe A par voie intraveineuse, à raison de 2 ml, 5 fois à 8 jours d'intervalle. Le sang des animaux est recueilli 8 jours après la dernière injection. Le sérum décomplémenté saturé avec

(*) Par ailleurs, la réaction de Middlebrook est négative pour les antisérums hyperimmuns préparés chez le lapin au moyen de cet antigène, confirmant ainsi ces essais.

des hématies humaines du groupe O, agglutine les globules rouges du groupe A au 1/1280 et les globules rouges de mouton au 1/320.

En revanche, les sérums anti-antigène somatique de Bacillus n'agglutinent ni les globules rouges groupe A, ni les globules rouges de mouton. Le tableau X récapitule les résultats obtenus.

TABLEAU X

Antigène	Sérum de lapin		
	Témoin	Immunisé avec hématies humaines Groupe A (*)	Immunisé avec l'antigène somatique
Hématies de mouton (*)	1/10	1/320	0
Hématies humaines Groupe A.	0	1/1280	0
Antigène somatique	1/10	1/10	1/640

(*) Forssman +.

Il n'existe donc pas d'antigénicité croisée entre l'antigène somatique d'une part, les hématies de mouton et les hématies humaines du groupe A d'autre part, lesquelles sont des antigènes de Forssman.

III. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ EXPÉRIMENTALE DE L'ANTIGÈNE

Dans les premières phases de notre étude (1953-1961), nous avions étudié l'activité immunitaire non spécifique de la souche de *Bacillus subtilis* vivante administrée par voie orale ou parentérale. Nous avons donc comparé l'activité de la souche vivante et des fractions que nous avons isolées, quant à leur activité immunitaire non spécifique, en utilisant la méthode que nous avons antérieurement décrite (10). Elle fait appel à la souris Swiss comme animal réactif et à une souche d'*Escherichia coli* 111 B4 comme germe pathogène d'épreuve.

Animaux

Souris Swiss strictement (*) de 19 à 21 g. Sexe indifférent.

Nous avons, dans toute la mesure du possible, utilisé des animaux provenant du même élevage (**). Pour des raisons d'ordre pratique, nous avons quelquefois dans le cours de ces sept années fait appel à d'autres éleveurs que notre habituel fournisseur, en limitant notre choix aux éleveurs contrôlés par le C.N.R.S. (Gif-sur-Yvette).

Les animaux sont répartis par groupes de 5 dans des bocaux en verre. Alimentation (***) et boisson *ad libitum*. Température du laboratoire 20 °C.

(*) L'étude de la pathogénicité étant une résultante, il est indispensable de se placer dans ces conditions rigoureuses afin d'homogénéiser les observations.
(**) Janvier — 53 — Le Genest.
(***) Aliment composé 103 — UAR — Villemoisson-sur-Orge.

Souche

Nous utilisons depuis 10 années, la même souche d'*Escherichia coli* 111 B4 provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Paris. Elle présente une virulence très stable et n'implique pas de difficultés particulières pour sa conservation.

Elle garde très longtemps sa virulence propre par repiquage linéaire sur gélose nutritive. Dans les cas, rares, de diminution de virulence, nous utilisons un repiquage à partir de la souche conservée sur sable stérile. Périodiquement, nous effectuons une vérification des caractères biochimiques et immunologiques (agglutination avec l'antisérum O. 111 B4 de l'Institut Pasteur de Paris).

Le pouvoir pathogène de cette souche a été étudié chez la souris :

Une suspension dans l'eau physiologique d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive est ajustée à 60 divisions, écran 55, du photomètre tricellule Jobin et Yvon.

L'inoculation par voie intrapéritonéale et sous-cutanée de 0,5 ml de la suspension-mère ou de dilutions au 1/2 et au 1/4 provoque la mort des animaux par septicémie entre 12 et 72 heures. Les animaux qui ont succombé à l'inoculation par voie intrapéritonéale présentent une réaction inflammatoire de la cavité péritonéale. Certaines souris inoculées par voie sous-cutanée présentent après 24 heures un œdème sous-cutané étendu.

Par prélèvement stérile de sang ou d'organes et culture sur milieux usuels, on peut réisoler le germe. Les propriétés biochimiques et la virulence du germe ainsi réisolé sont identiques à celles de la souche d'origine.

1° *Étude de l'activité immunitaire non spécifique envers Escherichia coli 111 B4*

La substance à étudier est injectée par voie intrapéritonéale, tandis que les témoins reçoivent du sérum physiologique. 24 heures plus tard, la souche pathogène est inoculée par voie intrapéritonéale. Nous rapportons les essais effectués avec l'antigène somatique.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la reproductivité du titrage.

— 100 souris Swiss de 19 à 21 g sont réparties en 2 lots de chacun 50 souris. Les animaux du premier lot (témoins) reçoivent, par voie intrapéritonéale, ½ ml d'eau physiologique. Les animaux du second lot reçoivent, également par voie intrapéritonéale, ½ ml d'antigène somatique à la dose de 800 µg.

— 24 heures plus tard, tous les animaux sont inoculés par voie intrapéritonéale, avec la suspension, pure ou diluée, d'*Escherichia coli* 111 B4.

10 de chaque lot reçoivent la suspension pure;
10 de chaque lot reçoivent la suspension diluée au 1/2;
10 de chaque lot reçoivent la suspension diluée au 1/4;
10 de chaque lot reçoivent la suspension diluée au 1/8;
10 de chaque lot reçoivent la suspension diluée au 1/16.

La lecture des résultats est faite après 7 jours d'observation. Le tableau XI récapitule les résultats de 3 essais et montre la bonne reproductibilité du titrage. Il apparaît à la lecture de ce tableau que la fraction exerce une protection certaine chez les souris inoculées avec la culture virulente, pure ou diluée au 1/2, et une protection totale chez les souris inoculées avec la même culture au 1/4 et au 1/8.

Nous avons alors étudié la modification de la dose léthale 50 p. 100 d'*Escherichia coli* 111 B4 dans les groupes témoins et traités :

480 souris Swiss de 19 à 21 g sont réparties en lots de 80 animaux chacun : un lot témoin et 5 lots traités avec la fraction somatique.

TABLEAU XI

	Suspension d'*Escherichia coli* 111 B4	Témoins	Traités
1er essai	Non diluée	10/10 (*)	6/10
	Diluée au 1/2	10/10	3/10
	Diluée au 1/4	10/10	0/10
	Diluée au 1/8	10/10	0/10
	Diluée au 1/16	6/10	0/10
2e essai	Non diluée	10/10	5/10
	Diluée au 1/2	10/10	3/10
	Diluée au 1/4	10/10	0/10
	Diluée au 1/8	9/10	0/10
	Diluée au 1/16	5/10	0/10
3e essai	Non diluée	10/10	6/10
	Diluée au 1/2	10/10	3/10
	Diluée au 1/4	10/10	0/10
	Diluée au 1/8	10/10	0/10
	Diluée au 1/16	5/10	0/10

(*) Au numérateur : nombre de souris ayant succombé à l'inoculation d'épreuve.
Au dénominateur : nombre de souris éprouvées. Cette même notation sera utilisée dans tout ce chapitre.

Les souris du lot témoin reçoivent par voie intrapéritonéale ½ ml d'eau physiologique.

Les souris des lots traités reçoivent par la même voie :

- un lot : ½ ml de suspension contenant 100 µg d'antigène;
- un lot : ½ ml de suspension contenant 200 µg d'antigène;
- un lot : ½ ml de suspension contenant 400 µg d'antigène;
- un lot : ½ ml de suspension contenant 800 µg d'antigène;
- un lot : ½ ml de suspension contenant 1600 µg d'antigène.

Tous les animaux sont inoculés 24 heures plus tard par voie intrapéritonéale avec des suspensions de germes préparées à partir d'une culture de 24 heures d'*Escherichia coli* 111 B4. La culture est émulsionnée dans l'eau physiologique de façon à

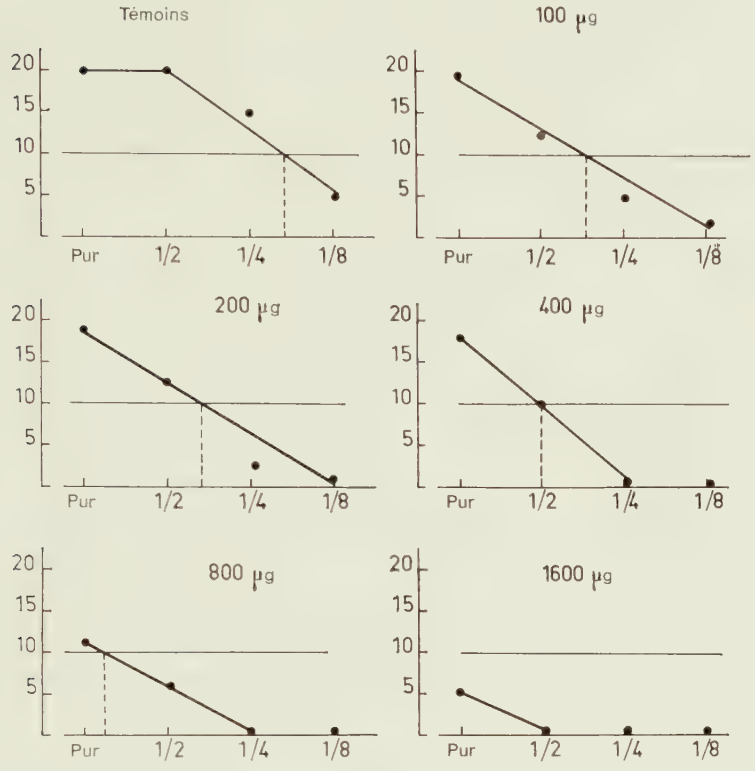

FIG. 6.

obtenir une opacité correspondant à 60 graduations du photomètre tricellule Jobin et Yvon écran 55 :

— 20 souris de chaque lot traité, ainsi que 20 souris témoins reçoivent ½ ml de culture pure,

— 20 souris de chaque lot traité, ainsi que 20 souris témoins, reçoivent ½ ml de culture diluée au 1/2,

TABLEAU XII

Escherichia coli 111 B4	TÉMOINS	ANTIGÈNE				
		100 µg/s	200 µg/s	400 µg/s	800 µg/s	1600 µg/s
Pur	20/20	20/20	19/20	18/20	11/20	5/20
1/2	20/20	13/20	13/20	10/20	6/20	1/20
1/4	15/20	5/20	2/20	0/20	0/20	0/20
1/8	5/20	2/20	2/20	0/20	1/20	0/20

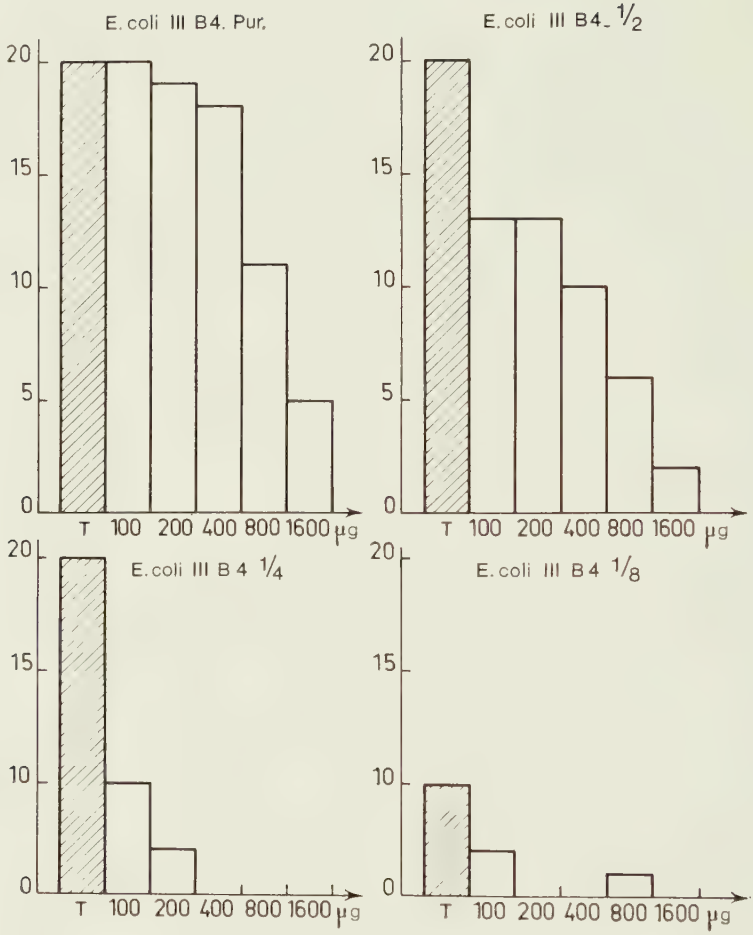

FIG. 7.

20 souris de chaque lot traité, ainsi que 20 souris témoins, reçoivent ½ ml de culture diluée au 1/4.

- 20 souris de chaque lot traité, ainsi que 20 souris témoins, reçoivent ½ ml de culture diluée au 1/8.

La lecture des résultats est faite après 7 jours d'observation. Nous avons rapporté les résultats dans le tableau XII et les figures nos 6 et 7.

L'activité est proportionnelle à la dose administrée. La D.L. 50 pour les animaux témoins correspond environ à la dilution au 1/6 de la suspension-mère du germe pathogène. Cette D.L. 50 passe au 1/3 de la dilution-mère chez les animaux traités avec 100 µg et au 1/2 chez les animaux traités par 400 µg. Pour 800 µg, la D.L. 50 est voisine de la suspension de germes la plus concentrée, soit 6 fois la D.L. 50 des

témoins; la dose de 1600 µg protège encore plus efficacement et ne permet pas de ce fait de calculer la D.L. 50 du lot ainsi traité (fig. n° 7).

L'examen des figures permet de constater qu'il existe une relation dose-effet pour chaque dilution. De ce fait, on peut calculer la dose protectrice à 50 p. 100 de l'ensemble des animaux traités (fig. n° 8). Notre expérience de cette infection expérimentale nous a permis de définir, pour la souche de souris que nous avons utilisée, les concentrations de germes qui permettent d'obtenir une mortalité voisine de 50 p. 100, 90 p. 100 ou 100 p. 100.

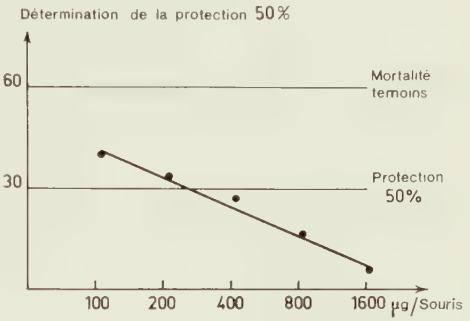

Fig. 8.

Nous avons donc réalisé un essai de contrôle sur 120 animaux en utilisant la dilution au 1/2, laquelle provoque une mortalité voisine de 100 p. 100 dans les conditions expérimentales décrites en tête de chapitre. Le tableau XIII rapporte les résultats obtenus.

TABLEAU XIII

Témoin	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	1600 µg
20/20	14/20	12/20	9/20	1/20	0/20

Cet essai confirme la relation dose-effet.

Ultérieurement, lors de contrôles de routine destinés à vérifier l'efficacité des divers lots (obtenus dans les mêmes conditions), nous avons utilisé la dilution d'*Escherichia coli* au 1/3. Nous avons confirmé que celle-ci provoque une mortalité statistiquement voisine de 90 p. 100. Dans ces conditions, le traitement des animaux par 800 µg d'antigène permet de réduire la mortalité à moins de 3 p. 100 : 135/150 chez les témoins, 4/150 chez les traités.

A. — En fonction du temps

Des groupes de 10 souris sont inoculés par voie intrapéritonéale, d'une part avec 0,5 ml de sérum physiologique, d'autre part, avec 0,5 ml d'une suspension contenant 800 µg d'antigène somatique. Selon l'horaire indiqué dans le tableau, ces souris reçoivent avant ou après le traitement 0,5 ml par voie intrapéritonéale d'une suspension en sérum physiologique d'*Escherichia coli* 111 B4. Cette suspension correspond à la dilution au 1/3 (tableau XIV).

TABLEAU XIV

Traitement par rapport a l'inoculation d'*Escherichia coli* 111 B4	*Avant*								*Après*		
	8 j	4 j	2 j	24 h	8 h	6 h	4 h	2 h	0 h	1 h	6 h
Témoins + H_2O φ 0,5 ml I.P.	10/10	9/10	7/10	10/10	8/10	9/10	8/10	10/10	8/10	9/10	9/10
Traités + 800 µg/souris I.P.	10/10	9/10	1/10	0/10	1/10	2/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10

L'activité débute à la 4e heure après l'injection, passe par un maximum à la 24e heure et s'annule le 4e jour.

B. — Effet « rebond »

Cette activité peut être suscitée de nouveau chez des animaux préalablement traités sans modification de la seconde réponse par rapport à la première. (tableau XV).

TABLEAU XV

Traitement avant l'inoculation d'*Escherichia coli* 111 B4			
Lots	8 j et 24 h	4 j et 24 h	24 heures
Témoins eau physiologique	10/10	8/10	10/10
Traités 800 µg/souris.	0/10	1/10	0/10

C. — Voie d'introduction

L'activité de l'antigène somatique reste identique lors des inoculations faites par voie intraveineuse, intra-péritonéale, intramusculaire ou sous-cutanée, mais elle est très faible par voie orale. Des animaux reçoivent par les voies étudiées 0,5 ml d'eau physiologique contenant 800 µg d'antigène somatique. Les témoins reçoivent de l'eau physiologique.

Escherichia coli 111 B4 est inoculé dilué au 1/2, 24 heures plus tard. Les résultats au 7e jour sont rapportés dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI

Lots	Voie d'administration du traitement				
	I.V.	I.P.	I.M.	S.C.D.	*per os*
Eau physiologique . .	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Antigène	0/10	0/10	2/10	0/10	8/10

D. — Comparaison de l'activité de l'antigène avec celle de la souche et des divers extraits

Nous avons comparé dans les mêmes conditions l'activité immunitaire non spécifique des échantillons suivants :

— culot microbien obtenu par centrifugation et remis en suspension dans l'eau (80 divisions écran 55 Photomètre Jobin et Yvon);

— poudre microbienne délipidée;

— poudre microbienne lysée par le lysozyme;

— poudre microbienne lysée par le lysozyme et les enzymes protéolytiques;

— fraction S.B.S;

— antigène somatique.

Les doses ont été calculées selon le rendement de l'extraction et peuvent donc être comparées à l'activité de l'émulsion microbienne. Le tableau XVII rapporte les résultats obtenus.

TABLEAU XVII

Témoins	Émulsion microbienne vivante	Poudre délipidée	Poudre + lysozyme	Poudre + lysozyme + trypsine	F.S.B.S.	Antigène somatique
10/10	0/10	1/10	0/10	0/10	1/10	0/10

Ces observations confirment sur le plan de l'immunité non spécifique l'excellente extraction de l'activité présente dans les corps bactériens. Nous avons donc étudié le parallélisme entre les activités immunitaires spécifiques et non spécifiques.

E. — Parallélisme entre l'activité antigénique spécifique et l'activité expérimentale immunitaire non spécifique

Nous avons étudié, d'une part, 4 lots portant les références SH_1, SH_2, SH_3 et SH_4, correspondant à des titres conformes aux normes établies, et d'autre part deux lots

TABLEAU XVIII

Lots	Titre	Activité
SH_1	1/640	0/10
SH_2	1/640	0/10
SH_3	1/320	0/10
SH_4	1/320	0/10
SHE_1	1/40	8/10
SHE_2	1/40	9/10
Témoin	0	10/10

portant les références SHE_1 et SHE_2 qui présentent des titres très bas. Un contrôle de l'activité immunitaire non spécifique a été effectué avec la suspension d'*Escherichia coli* 111 B4 diluée au 1/3. Les titres sont indiqués dans le tableau XVIII.

L'examen de ce tableau confirme bien le parallélisme entre les deux activités.

2° *Activité envers des infections provoquées par d'autres souches microbiennes*

A. — Entérobactéries

Des essais ont été pratiqués avec d'autres souches d'entérobactéries, telles une souche d'*Escherichia freundii* et une souche de *Proteus vulgaris*. Elles ont été, d'abord, étudiées en vue de déterminer leurs doses minima léthales (DML), puis l'éventuelle action immunitaire non spécifique de l'antigène somatique envers ces infections. Un protocole expérimental semblable à celui que nous avons utilisé pour *Escherichia coli* 111 B4 a été employé (tableau XIX).

TABLEAU XIX

Souche	Dilution de la suspension de germes	Témoins	Antigène
Escherichia freundii (*)	1/4	10/10	0/10
	1/8	6/10	1/10
Proteus vulgaris (*)	1/4	10/10	0/10
	1/8	8/10	0/10

(*) Suspension mère — 60 divisions — Écran 55.

B. — Microcoques

α) *Staphylocoque.* — Nous avons également effectué des essais en vue de mettre en évidence le pouvoir protecteur de l'antigène somatique chez des souris inoculées avec une souche de *Staphylococcus pyogenes* pathogène.

La virulence, la stabilité et les caractères biochimiques de cette souche provenant de notre collection, ont été préalablement éprouvés. Elle coagule le plasma oxalaté, fermente le mannitol, lyse la gélatine et la fibrine.

- 120 souris Swiss, de 19 à 21 grammes, sont réparties en 2 lots, de chacun 60 souris : — celles du premier lot (témoins) reçoivent, par voie intrapéritonéale, ½ ml d'eau physiologique, — celles du second lot reçoivent, également par voie intrapéritonéale, ½ ml d'une suspension d'antigène somatique titrant 1,5 mg par ml, soit 750 µg d'antigène par animal.

Vingt-quatre heures plus tard, tous les animaux sont inoculés par voie intrapéritonéale, avec une culture sur gélose (culture sur gélose inclinée, mise en suspension dans 3 ml d'eau physiologique) du staphylocoque P :

20 de chaque lot reçoivent la culture pure;

20 de chaque lot reçoivent la culture diluée au 1/2;
20 de chaque lot reçoivent la culture diluée au 1/4.
La lecture des résultats est faite après 7 jours d'observation (tableau XX).

TABLEAU XX

Staphylococcus pyogenes	EAU PHYSIOLOGIQUE	ANTIGÈNE SOMATIQUE
Pure	20/20	16/20
au 1/2	17/20	6/20
au 1/4	15/20	6/20

β) *Streptocoque hémolytique.* — Des essais d'activité immunitaire non spécifique ont été également réalisés envers une souche de streptocoque hémolytique, dans des conditions expérimentales semblables à celles utilisées pour le staphylocoque (tableau XXI).

TABLEAU XXI

Streptococcus pyogenes A	EAU PHYSIOLOGIQUE	ANTIGÈNE SOMATIQUE
0,5 ml I.P.	15/15	5/15

L'activité de l'antigène envers les infections expérimentales provoquées chez la souris par les microcoques, bien que très significative, est moins nette que celle notée pour les entérobactéries.

3° *Activité envers la toxine staphylococcique*

L'activité de la toxine staphylococcique est fonction de l'échantillon utilisé (activités hémolytique, coagulante, protéolytique, etc.), de la voie d'administration et de la sensibilité propre des divers lots de souris.

La voie d'administration la plus sévère est la voie intrapéritonéale. Aux doses toxiques, les souris meurent en 6 à 24 heures, présentant à l'autopsie une réaction inflammatoire péritonéale importante avec une quantité variable d'exsudat. Par voie sous-cutanée, la toxicité est plus faible.

A. — ADMINISTRATION PRÉVENTIVE

Des souris Swiss de 18 à 20 g, distribuées par lots de 10 animaux témoins et traités, sont inoculées avec 0,5 ml d'antigène somatique par voie intramusculaire pour le lot traité, et avec 0,5 ml d'eau physiologique par la même voie pour le lot témoin. 24 heures plus tard, les 2 lots reçoivent sous le volume de 0,5 ml une dose

léthale de toxine straphylococcique α par voie sous-cutanée; 1,5 mg /souris de l'antigène confère une certaine protection aux animaux traités.

B. — Administration simultanée

Nous avons obtenu des résultats intéressants en inoculant en même temps la la toxine staphylococcique par voie intrapéritonéale et l'antigène somatique par voie intramusculaire (tableau XXII).

TABLEAU XXII

Traitement	Témoin eau physiologique	Antigène somatique	
		750 µg /souris	1500 µg /souris
I.M.	40 /50	29 /50	16 /50
Per os	16 /20	15 /20	6 /20

4° *Renforcement de l'immunité spécifique*

Avec M. G. Gayot, M. et Mme L. Dhennin, nous avons étudié la valeur de l'immunité conférée par un vaccin anti-aphteux chez la souris avec ou sans utilisation conjointe de la fraction S.B.S. Nous avons utilisé une méthode qui permet d'obtenir une évaluation quantitative du potentiel protecteur des vaccins anti-aphteux inactivés par détermination de la dose vaccinale 50 p. 100 (*).

Cette méthode utilise des souris consanguines C 57 Bl 6 âgées de 12 semaines ± 3 jours. Après constitution en groupes randomisés, les souris sont immunisées, chaque groupe recevant une dose choisie de telle façon que la différence de volume injecté soit, de groupe à groupe, égale en expression logarithmique. Lorsque cet intervalle logarithmique est situé entre 0,2 et 0,5 avec centrage aux environs de 1, il existe une relation linéaire entre la dose inoculée et la proportion d'animaux survivant à une épreuve par une dose fixe de virus murinisé. La moyenne de la loi dose-effet ainsi déterminée, calculée par les probits dits de maximum de vraisemblance, est la dose vaccinale 50 p. 100 de l'antigène utilisé. Cette méthode qui conduit à une estimation de la variance de la DV 50 permet la comparaison de l'efficacité de deux produits et autorise à mesurer une éventuelle différence entre eux ou, si l'on veut, à chiffrer la puissance relative de l'un par rapport à l'autre.

104 souris C 57 Bl 6 âgées de 12 semaines ± 3 jours, provenant du Centre de Sélection des Animaux de Laboratoire de Gif-sur-Yvette dépendant du C.N.R.S., ont été utilisées.

Deux groupes A et B sont constitués par randomisation :

— le premier groupe (A) reçoit uniquement le vaccin;

— le second groupe (B) reçoit le vaccin et la fraction somatique.

(*) G. Gayot, Mme L. Dhennin et L. Dhennin : *Bull. Off. Int. Épiz.*, 1964, **61**, 1079-1089.

Le vaccin est une préparation commerciale trivalente où l'antigène viral adsorbé sur hydroxyde d'alumine est inactivé par le formol. La vaccination est effectuée par la voie sous-cutanée à dose croissante. Chacun des groupes A et B est réparti par randomisation en 3 sous-groupes : 1, 2, 3 qui reçoivent respectivement 3,1 - 6,3 et 12,5 centièmes de millilitre de vaccin.

Les sous-groupes A ne reçoivent que le vaccin; les sous-groupes B reçoivent le vaccin et la fraction de *Bacillus*. Ce produit est administré par voie intrapéritonéale 2 fois à raison de 800 µg en solution dans l'eau déionisée. Les injections de l'antigène ont lieu, la première le lendemain de la vaccination, la seconde, 4 jours après. 15 jours après le début de l'immunisation, tous les animaux sont éprouvés, par voie intrapéritonéale, à l'aide d'une dilution à 1 p. 1000 de virus aphteux à son 95e passage sur souris.

L'observation quotidienne des animaux, poursuivie pendant 12 jours, a permis d'établir le tableau XXIII où les fractions de chaque colonne indiquent le résultat final retenu, le numérateur étant le nombre d'animaux survivants, le dénominateur le nombre d'animaux vaccinés et éprouvés.

TABLEAU XXIII

Doses de vaccin en 1/100 de ml	3,1	6,3	12,5
Logarithme de la dose	0.49	0.79	1.09
A : vaccin seul	0/17	5/17	9/18
B : vaccin + fraction somatique	4/17	9/18	14/17

Ce résultat est statistiquement significatif au seuil de confiance 5 p. 100 et prouve l'effet de stimulation non spécifique exercé par l'antigène somatique de *Bacillus*. Il ne s'agit pas d'un effet adjuvant au sens strict puisque l'antigène manifeste ici son activité par voie générale.

5° *Activité anti-tumorale*

Il est bien connu que certaines substances possédant un effet immunitaire non spécifique présentent une activité anti-tumorale expérimentale (24). Nous avons pensé utile d'étudier l'activité de notre antigène envers diverses tumeurs expérimentales de la souris et du rat.

Chez la souris, nous avons étudié le sarcome d'Ehrlich sur la souche Swiss, la tumeur T 26-33 sur la souche C 3H, la tumeur P 815 (mastocytome de Dunn et Potter) sur la souche ML-TB (17). Chez le rat, nous avons étudié l'activité de l'antigène envers la tumeur T8 sur la souche Wistar et la tumeur T 58 sur la souche St-Louis. De l'ensemble de nos essais, seuls quelques résultats positifs ont été notés avec le sarcome d'Ehrlich.

Notre souche est entretenue sous sa forme ascitique par passage hebdomadaire sur une souche Swiss. La numération des cellules contenues dans l'ascite est effectuée à chacun des passages et avant les expérimentations. Cette numération est effectuée, après destruction des hématies (liquide de Hayem); cette précaution est indispensable car assez fréquemment la ponction ramène un liquide hématique.

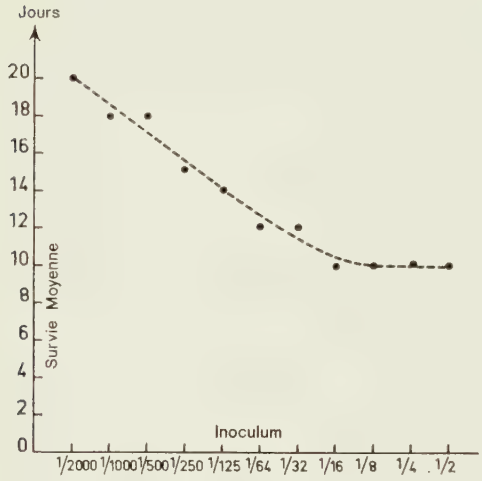

Fig. 9.

a) Influence des dilutions par voie intrapéritonéale

Il est clair que le nombre de cellules injectées influence la rapidité de l'évolution. Nous avons donc pratiqué des essais qui ont montré qu'il était possible d'obtenir 100 p. 100 de greffe de la tumeur ascitique jusqu'à la dilution 1/2 000. Au-dessus, un certain pourcentage d'animaux survit sans présenter d'ascite. La figure n° 9 rapporte les résultats observés en fonction de l'inoculum.

Dans nos essais par voie intrapéritonéale, nous utilisons la dilution au 1/1 000 qui correspond à environ 20 000 cellules inoculées et qui donne un temps de survie compris entre 16 et 20 jours.

b) Voie sous-cutanée

L'évolution de la tumeur par voie sous-cutanée est directement influencée par le sexe. En greffant, sur des lots des 2 sexes, 1/10 de ml d'ascite par la voie sous-cutanée, nous avons constaté que les femelles présentent le plus généralement des tumeurs de petite taille à évolution lente, tandis que les mâles présentent de volumineuses tumeurs atteignant la taille de grosses noix et de poids voisin, après autopsie, de 10 à 12 g.

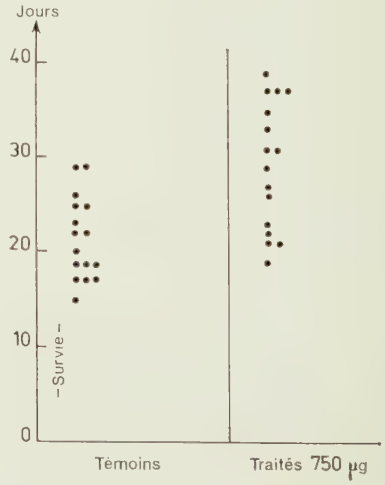

Fig. 10.

c) Essais thérapeutiques

Voie intrapéritonéale : les animaux, greffés avec la dilution d'ascite au 1/1 000, ont été répartis en 2 groupes de 16 animaux.

Les animaux traités recevaient 750 µg d'antigène sous le volume de 0,5 ml par voie intrapéritonéale tous les 2 jours. Les résultats sont rapportés dans la

figure nº 10. Les moyennes de survie sont de 20 jours pour les témoins et 29,1 jours pour les animaux traités, soit une moyenne de survie de 45 p. 100 supérieure à celle des témoins. Dans nos conditions expérimentales, l'activité antitumorale de l'antigène est donc faible.

6º *Activité anti-inflammatoire*

Les travaux que nous avons réalisés avec M. R. Richou, Mmes A. Schwartz et H. Richou font l'objet d'un travail séparé (16). Ils ont confirmé l'activité anti-inflammatoire de l'antigène somatique, activité que nous avions antérieurement décrite au sujet du lysat enzymatique des corps microbiens de la souche de *Bacillus subtilis* L. Cette activité a été objectivée notamment envers un modèle expérimental utilisant les toxines staphylococciques comme agent d'inflammation (15). En 1966, F. Deprez, dans un travail effectué dans notre laboratoire, a montré les possibilités d'utilisation expérimentale de ce modèle d'inflammation aiguë (6).

III. — ÉTUDE DU MODE D'ACTION

L'activité expérimentale de l'antigène somatique pose le problème de son mode d'action. Nous avons évoqué la possibilité :

1º d'une activité antibiotique de la fraction envers les germes pathogènes utilisés;

2º d'anticorps croisés entre la fraction utilisée et les germes envers lesquels elle exerce son action;

3º d'une modification de la synthèse des anticorps spécifiques;

4º d'une action envers le complément;

5º d'une action sur le pouvoir bactéricide du sérum;

6º d'une action sur le système lympho-réticulaire.

1º *Étude de l'activité antibiotique de l'antigène somatique*

Une solution renfermant 5mg d'antigène au ml a été utilisée dans cet essai. Dans des séries de tubes contenant 4 ml de bouillon *R.A.P.*, on ajoute des quantités variables : 1, 1/3, 1/10, 1/30, 1/50, 1/100, 1/300, etc., ml de la solution d'antigène à étudier, puis 1/10 ml d'une culture de 24 heures en bouillon du germe à étudier. Après agitation, on place les tubes à l'étuve à 37 ºC. Nous avons constaté que des cultures s'étaient développées dans tous les tubes, les germes ensemencés étant :

— *Streptococcus pyogenes* hem. A.

— *Staphylococcus aureus* P et L

— *Escherichia coli* 36 et 111 B4

— *Escherichia freundii*

— *Serratia marcescens* 173 et R
— *Proteus vulgaris* Classe et L
— *Pseudomonas aeruginosa*

L'efficacité expérimentale n'est donc pas liée à une activité antibiotique.

2° *Recherche d'anticorps croisés*

Du fait de l'activité toute particulière de l'antigène du *Bacillus* L envers l'infection provoquée par *E. coli* 111 B4, nous avons recherché s'il n'existait pas d'anticorps croisés provoqués par les souches de *Bacillus subtilis* L et celles d'*Escherichia coli* 111 B4.

Sérum anti-subtilis : Ce sérum a été préparé chez le lapin selon la technique indiquée dans notre premier chapitre.

Sérum anti-Escherichia coli 111 B4 : quatre lapins dépourvus d'immunité anti-*Escherichia coli* 111 B4 naturelle ont reçu, par voie intraveineuse, à 7 jours d'intervalle, 5 injections de 1 ml d'une suspension en eau physiologique d'une culture de 18 heures sur gélose nutritive d'*Escherichia coli* 111 B4. Cette suspension correspond à la dilution au 1/2 de la suspension-mère précédemment décrite.

Dix jours après la dernière injection, les lapins sont sacrifiés par exsanguination. Le tableau XXIV rapporte les résultats observés avec les souches et leurs anti-sérums.

TABLEAU XXIV

Antigène	Sérum anti-*Escherichia coli* 111 B4	Sérum anti-*Subtilis* L. chauffé
Escherichia coli 111 B4. . . .	1/1600	0
B. subtilis L	1/10	1/1600

3° *Influence sur la synthèse des anticorps*

Nous avons étudié l'activité de l'antigène comme adjuvant et stimulant immunitaire ou comme modificateur de tolérance antigénique. Nous avons pris comme modèle l'immunité antistaphylococcique (*).

1er essai. — 15 lapins d'un poids moyen de 2 kg, dépourvus d'immunité antistaphylococcique d'origine naturelle, ont été immunisés selon le protocole suivant :

3 injections à 4 jours d'intervalle de 1, 2 et 4 ml des mélanges ci-dessous :

Série I : 20 ml d'anatoxine staphylococcique n° 4249-4250 (dose combinée hémolytique = + 0,10 - 0,15) + 10 ml d'eau physiologique.

(*) Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec M. R. Richou que nous remercions bien vivement de son aide précieuse et de ses conseils.

Série II : 20 ml d'anatoxine + 10 ml d'eau physiologique renfermant 6 mg d'antigène /ml.

Série III: 20 ml d'anatoxine + 10 ml d'eau physiologique.

Les animaux de la série III recevaient en outre, par voie sous-cutanée, sous le volume de 2 ml : lors de la première injection, 2 mg d'antigène; lors de la deuxième injection 4 mg d'antigène et, lors de la troisième injection, 8 mg d'antigène dans l'eau physiologique.

Réactions :

— *Série I* : aucune réaction;

— *Série II* : quelques réactions locales;

— *Série III:* quelques réactions au niveau du point d'injection de l'antigène de *Bacillus*.

Tous les animaux sont saignés, 7 jours après la dernière injection et l'antitoxine staphylococcique est titrée par la méthode de neutralisation de l'hémolysine α dans chaque sérum séparément et dans les mélanges des sérums de chaque série.

Le tableau XXV rend compte des résultats obtenus.

En mélange avec l'anatoxine ou injecté par voie sous-cutanée en un autre point

TABLEAU XXV

Antigène injecté	N° des lapins	Titre antitoxique (en unités)
Série I Anatoxine seule	1	+ 15 - 20
	3	+ 15 - 20
	5	+ 5 - 7
	7	+ 3 - 5
	9	mort
	mélange sérums	+ *10 - 15*
Série II Anatoxine + Antigène (en mélange)	45	+ 20 - 30
	47	+ 20 - 30
	49	20
	51	+ 7 - 10
	55	+ 10 - 15
	mélange sérums	+ *15 - 20*
Série III Anatoxine + Antigène (en points séparés)	57	+ 15 - 20
	61	+ 20 - 30
	63	+ 10 - 15
	67	+ 2 - 3
	69	+ 7 - 10
	mélange sérums	+ *10 - 15*

du corps que l'anatoxine, l'antigène ne modifie pas la production de l'antitoxine spécifique. Il n'existe donc pas d'effet adjuvant ou stimulant de l'immunité.

2e essai. — 10 lapins, dépourvus d'immunité antistaphylococcique d'origine

naturelle et répartis en 2 séries de chacune 5 lapins, ont été immunisés selon le protocole ci-dessous :

Série I : — 1re injection = 2 ml d'anatoxine staphylococcique.
— 2e injection = 3 ml d'anatoxine staphylococcique.
— 3e injection = 4 ml d'anatoxine staphylococcique.

Série II : — les animaux de cette série ont été immunisés exactement comme ceux de la série I et ont reçu, en outre, par voie intrapéritonéale :

— 2 mg d'antigène lors de la première injection;
— 4 mg d'antigène lors de la deuxième injection;
— 8 mg d'antigène lors de la troisième injection.

Les animaux ont été saignés 7 jours après la dernière injection et l'antitoxine a été titrée dans chaque sérum séparément et dans les mélanges des sérums de chaque série (tableau XXVI).

Dans cette série, le titre de l'antitoxine obtenue chez les témoins est plus faible que dans l'expérimentation précédente du fait de l'emploi d'une anatoxine de moins bonne qualité.

TABLEAU XXVI

Série	N° des lapins	Titre antitoxique (unités)	
		Avant rappel	Après rappel
Série I Anatoxine seule sous-cutanée	11	+ 7 - 10	+ 20 - 30
	13	+ 0,5 - 1	+ 10 - 15
	35	+ 1 - 3	+ 15 - 20
	39	+ 7 - 10	mort
	73	+ 3 - 5	+ 5 - 7
	mélange sérums	*+ 3 - 5*	*+ 10 - 15*
Série II Anatoxine sous-cutanée + Antigène intra-péritonéal	25	+ 3 - 5	+ 5 - 7
	21	+ 7 - 10	+ 10 - 15
	41	+ 0,5 - 1	+ 15 - 20
	19	+ 3 - 5	+ 10 - 15
	22	+ 3 - 5	+ 7 - 10
	mélange sérums	*+ 3 - 5*	*+ 10 - 15*

Après injections de rappel, on ne constate aucune différence entre les 2 séries.

Par ailleurs, nous avons vérifié par injection de l'antigène somatique seul, chez des animaux antérieurement immunisés avec l'anatoxine seule, qu'il n'existait pas de réaction de type anamnésique.

4° *Activité envers le complément*

Les essais ont été réalisés *in vitro* et *in vivo*.

a) In vitro

Nous avons effectué les titrages du complément (C′) en l'absence et en présence de l'antigène d'après la méthode de P. Roulier (*).

En utilisant volume à volume une quantité fixe de C′ (2 unités 50 %) et 6 mg/ml d'antigène, on observe une légère activité anti-complémentaire. Afin de titrer cette activité, nous avons utilisé la méthode suivante, nécessitée par le fait que les plus fortes concentrations d'antigène donnent une suspension opalescente.

— 0,75 ml de différentes concentrations d'antigène sont mis en présence de 0,75 ml de C′ (2 unités 50 %). On incube 10 minutes à 37 °C et on ajoute 1,5 ml de globules rouges sensibilisés. On laisse 45 minutes à 37 °C en agitant de temps en temps; on centrifuge et on effectue la lecture par comparaison avec des tubes témoins (tableau XXVII) où le degré d'hémolyse est exprimé de HO à H8.

TABLEAU XXVII

Concentration (en mg)									
0	1	2	4	6	8	10	12	16	32
H8	H8	H8	H6	H6	H4	H2	H0	H0	H0

Cette activité est donc particulièrement faible et vraisemblablement sans relation avec l'activité immunitaire non spécifique mentionnée dans ce travail.

b) In vivo

Sur 6 lapins, d'un poids moyen de 2 kg, nous avons effectué un prélèvement de sang par ponction cardiaque. Les animaux reçoivent 2 heures plus tard, par voie sous-cutanée, 2 ml d'eau physiologique pour les 3 témoins et 2 ml d'une suspension d'antigène à 30 mg/ml pour les 3 traités. De nouveaux prélèvements de sang sont pratiqués à la 24e et 48e heure après l'injection. Les résultats des titrages du complément figurent au tableau XXVIII.

L'examen de ce tableau montre que, dans les conditions expérimentales, il n'existe pas d'augmentation du complément chez les animaux traités. Il ne semble donc pas que l'antigène somatique du *Bacillus subtilis* L agisse comme les substances

(*) Roulier (P). — *Rec. Trav. Inst. Nation.Hyg.*, 1952, **4**, 823 et Thèse de Pharmacie, Montpellier, 1951.

TABLEAU XXVIII (*)

Lapins		0 h	24 h	48 h
Témoins	1	0,50	0,45	0,45
	2	0,55	0,55	0,50
	3	0,40	0,43	0,70
Traités	4	0,40	0,45	0,45
	5	0,35	0,45	0,45
	6	0,45	0,45	0,40

(*) Résultats en ml de sérum au 1/10.

dénommées par les auteurs anglo-saxons « properdin-like », lesquelles ont la propriété d'augmenter l'activité complémentaire du sérum après une phase transitoire de déplétion.

5° *Action sur le pouvoir bactéricide du sérum*

Des essais préliminaires au moyen de numérations sur plaque nous ont montré l'activité bactéricide du sérum frais envers la souche d'*Escherichia coli* 111 B4 que nous avons utilisée au cours de notre expérimentation, ce qui confirme les données classiques. Nous avons pensé que l'antigène somatique du *Bacillus* était susceptible d'augmenter cette propriété naturelle chez les animaux traités. Nous avons donc pratiqué l'expérience suivante :

2 lots de 5 souris ont été injectés par voie intrapéritonéale, l'un avec de l'eau physiologique et l'autre avec 800 µg d'antigène somatique sous le volume de 0,5 ml. A la 24e heure, nous avons effectué un prélèvement de sang sur chacun des animaux par ponction rétro-orbitaire. Le sang des animaux de chaque lot est mélangé de façon à constituer 2 échantillons sur lesquels nous avons pratiqué des études d'activité bactéricide envers une suspension en sérum physiologique de la souche d'*Escherichia coli* 111 B4 cultivée pendant 24 heures sur gélose nutritive.

La dite suspension correspond à la densité optique utilisée pour l'inoculation des animaux dans les expériences antérieures. L'incubation a été réalisée volume à volume pendant 3 heures. Le sang a été prélevé sur héparine, dans des conditions stériles et mélangé avec les dilutions de la suspension. Après cette incubation, des

TABLEAU XXIX

	Animaux témoins	Animaux traités
Escherichia coli — Nombre de germes en millions (*)	11,7	12,8

(*) Ces chiffres correspondent au nombre de germes par ml du mélange d'incubation.

numérations de germes sont effectuées selon la méthode classique de dilutions sur plaque (8). Le tableau XXIX indique la moyenne des résultats obtenus.

Puisque le traitement des animaux ne paraît pas influencer l'activité bactéricide du sérum, nous avons pensé que l'activité expérimentale de l'antigène somatique, envers l'infection expérimentale provoquée chez la souris par *Escherichia coli* 111 B4, pouvait être liée à une modification du pouvoir anti-végétatif du sang. Nous avons donc étudié l'activité anti-végétative du sang des animaux témoins et des animaux préalablement traités par l'antigène somatique (dans les mêmes conditions que ci-dessus) puis inoculés par voie intrapéritonéale avec la souche d'*Escherichia coli* 111 B4 (tableau XXX).

TABLEAU XXX

	Animaux inoculés avec la souche d'*Escherichia coli* 111 B4	
	Témoins	Traités avec antigène
Escherichia coli — Nombre de germes en millions	Incomptable +++	17,9

On peut donc constater que, chez les animaux non traités, le sang a totalement perdu tout pouvoir anti-végétatif alors que, chez les animaux traités par l'antigène somatique, il conserve une activité voisine de celle observée chez les animaux non inoculés, quoiqu'un peu diminuée par rapport à ceux-ci.

Ces essais nous permettent donc de conclure que l'injection de l'antigène somatique n'augmente pas le pouvoir bactéricide du sérum mais qu'elle agit sur le pouvoir anti-végétatif. En effet, celui-ci s'effondre chez les animaux non traités inoculés avec *Escherichia coli* 111 B4, alors qu'il demeure à un niveau comparable à celui des animaux non inoculés chez les souris traitées par l'antigène somatique. Ces essais sont corroborés par l'expérience suivante :

20 souris Swiss de 19 à 21 g, sont ponctionnées dans le sinus rétro-orbitaire, avec une pipette Pasteur. L'échantillon de sang obtenu sert aux formules et aux numérations globulaires.

Les animaux sont alors divisés en 4 groupes de 5 et reçoivent par voie intrapéritonéale :

— les groupes n° 1 et n° 2 0,5 ml d'eau physiologique;

— les groupes n° 3 et n° 4 0,5 ml d'eau physiologique renfermant 800 µg d'antigène.

24 heures après, les animaux des groupes n° 2 et n° 4 sont inoculés par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml de la suspension d'*Escherichia coli* 111 B4, diluée au 1/3.

14 heures après l'administration du germe pathogène, un nouveau prélèvement est effectué sur tous les animaux par voie rétro-orbitaire. Le tableau XXXI rapporte les moyennes observées.

TABLEAU XXXI

Groupes	Moyenne des leucocytes par groupe	
	au début de l'essai	à la fin de l'essai
Témoin	8.300	8.460
Antigène somatique seul	7.150	6 900
Témoins inoculés avec *Escherichia coli* 111 B4	8 570	3 675
Traités par antigène somatique, puis inoculés avec *Escherichia coli* 111 B4	6 700	5 730

Tout se passe donc comme si l'antigène se comportait comme un facteur protecteur envers la leucopénie provoquée par l'infection à *Escherichia coli* chez la souris.

7° *Action sur le système lympho-réticulaire*

A. — Étude sur la capacité phagocytaire des cellules macrophagiques

Nous avons utilisé une infection parasitaire, provoquée par *Trypanosoma equiperdum*, chez la souris et le rat (*). Ce *trypanosoma* monomorphe du groupe *Evansi*, est l'agent de la dourine des Équidés. Chez la souris et le rat, il provoque une infection constamment mortelle qui évolue en 72 à 96 heures. La rapidité d'évolution de la maladie permet de penser que l'immunité naturelle est plus particulièrement en jeu dans la résistance des animaux. Si l'infection se prolonge, les trypanosomes peuvent s'adapter à l'immunité spécifique de l'hôte (7,15).

Des travaux de R. Pautrizel et collaborateurs ont permis de préciser que, sous l'action de certains produits, l'évolution de la maladie est modifiée (19, 20). Dans le cas où elle est bénéfique, elle provient d'une augmentation de la défense de l'organisme et s'effectue par l'élévation de la capacité phagocytaire des cellules macrophagiques du système histiocytaire.

Nous avons utilisé des souris Swiss et des rats Wistar, inoculés par voie intrapéritonéale.

Le protocole général consiste à administrer l'antigène somatique de *Bacillus* à des temps variables par rapport à l'infestation; un lot témoin reçoit, en eau physiologique, le même volume que les animaux traités.

Deux facteurs de variations ont été retenus :

— apparition dans le sang circulant des trypanosomes.

— mortalité.

(*) Étude réalisée en collaboration avec J.-H. Bezian, Laboratoire d'immunologie, Faculté de Médecine de Bordeaux (Prof. R. Pautrizel).

a) 1re EXPÉRIENCE. — SOURIS : *Matériel et méthodes.* — 14 lots de 12 souris Swiss de 20 g ± 1 ont été répartis en 7 groupes comprenant chacun un lot témoin et un lot traité. Les animaux des groupes traités ont reçu par voie intrapéritonéale la dose de 750 µg d'antigène à des temps variables avant l'inoculation : 4 jours, 3 jours, 2 jours, 1 jour et le même jour. L'inoculation a été pratiquée par voie intrapéritonéale à raison de 1 000 trypanosomes par animal.

Tous les matins la mortalité a été notée dans chaque lot. Un frottis sanguin sur lame a été effectué chez les survivants. Après coloration par le May-Grunwald Giemsa, la lame est examinée au microscope pour la recherche des parasites.

Résultats. — Une nette aggravation de l'infestation et de la mortalité a été notée chez les animaux traités avec l'antigène 4 jours et 3 jours avant l'inoculation avec le parasite. Injecté en même temps que le parasite, l'antigène n'a aucune action. Par contre une nette protection a été notée chez les animaux du lot traité 48 heures avant l'inoculation des trypanosomes.

b) 2e EXPÉRIENCE. — RATS : la souche de trypanosomes a été passée de la souris aux lapins. Le sang de l'animal a été prélevé lorsque celui-ci a présenté les signes cliniques de l'évolution de la maladie. Nos essais ont porté sur 12 rats Wistar de 180 g répartis en 2 lots de 6 animaux. Les rats témoins ont reçu 1 ml d'eau physiologique par voie intrapéritonéale et les rats traités 6,75 mg d'antigène, par la même voie. Cette dose a été calculée en poids par rapport à la dose utilisée chez la souris. 48 heures après, les 2 lots ont reçu 1 000 trypanosomes par voie intra-péritonéale. Un frottis est effectué matin et soir.

Résultats. — Deux jours après l'infestation, 5 rats du lot traité et 1 rat du lot témoin présentent un frottis positif. Le lendemain, tous les animaux sont positifs. Le 5e jour au matin, tous les rats traités ont succombé et les animaux témoins meurent durant les 5e et 6e jours.

Le lot traité a donc présenté une infestation et une mortalité supérieures à celles du lot témoin, bien que les différences portent sur des temps courts. Ces faits peuvent s'expliquer par un effet diphasique au niveau du système réticulo-endothélial. La dose injectée, calculée d'après la dose efficace chez la souris, provoque vraisemblablement une phase de déplétion plus longue. Il pourrait exister aussi une différence entre la réponse du système réticulo-endothélial du rat et de la souris à l'effet de cet antigène, ainsi qu'il a été montré notamment par BIOZZI (2) pour d'autres substances.

Dans certaines conditions particulières chez la souris, l'antigène somatique extrait du *Bacillus subtilis* exerce une action sur la capacité phagocytaire des cellules macrophagiques.

Cette activité reste faible, même dans les circonstances les plus favorables, et est insuffisante pour expliquer l'action si nette observée lors des infections provoquées par les entérobactéries. Il est logique de penser que l'effet de stimulation provoqué par l'antigène peut s'exercer envers d'autres cellules participant également au mécanisme de défense. En effet, les macrophages ne représentent qu'une partie de la capacité de défense de l'organisme et les trypanosomes sont de grosses cellules par rapport

aux cellules bactériennes. Nous avons donc étudié l'action envers le système réticulo-endothélial par la mesure de la production des euglobulines et la stimulation des cellules de la rate et du foie. Cette dernière étude nous a permis d'utiliser la souris comme animal réactif et l'infection provoquée par l'*Escherichia coli* 111 B4, c'est-à-dire les conditions expérimentales mêmes dans lesquelles nous avons la pratique de la mise en évidence de l'activité immunitaire non spécifiquede l'antigène.

B. Étude de la stimulation du système réticulo-endothélial

Nous avons étudié l'effet de stimulation du système réticulo-endothélial par le titrage des euglobulines selon la méthode de Sandor par la technique de Vargues. En 1959, nous avons étudié les variations de la fiche réticulo-endothéliale du cobaye et du lapin sur plus de 1 000 sérums dans le cours de diverses infections expérimentales. Cet examen, simple dans sa réalisation et très reproductible, permet chez le cobaye une exploration de l'activité de synthèse des diverses euglobulines par le système réticulo-endothélial (13).

Animal d'expérience. — Cobayes tricolores de 300 g ± 20 répartis en 3 groupes homogènes de 5 animaux.

Protocole expérimental. — Sur tous les animaux, un prélèvement de sang a été effectué par ponction cardiaque à raison de 3 à 4 ml par animal.

— 5 jours après le prélèvement (temps nécessaire pour éviter des anomalies liées au prélèvement sanguin), chaque groupe reçoit la première injection d'une série de 8 injections intrapéritonéales pratiquées tous les 3/4 jours :
— le groupe témoin reçoit par voie intrapéritonéale 1 ml d'eau physiologique,
— les 2 autres groupes reçoivent par voie intrapéritonéale 1,5 mg d'antigène somatique, provenant de 2 lots différents, sous le volume de 1 ml.

Un prélèvement est effectué 4 jours après la dernière injection. Les détails de la technique utilisée ont été antérieurement décrits (13). Le tableau XXXII rapporte la moyenne des résultats obtenus pour chaque lot.

TABLEAU XXXII

Lots		pH 7,4	pH 6,9	pH 6,4	pH 5,8	pH 5,3	pH 4,6	pH 4,1	pH 3,6	Total
Témoins	av.	9,00	12,0	48,75	62,25	36,00	21,75	12,75	9,75	212
	ap.	2,25	6,75	42,00	75,75	42,25	29,25	15,5	4,50	218
Antigène SH_1	av.	0	14,25	55,5	67,5	33,75	19,5	12,00	3,00	205
	ap.	0,75	5,25	20,75	91,5	56,00	33,75	20,25	11,25	239
Antigène SHD	av.	0	6,75	55,5	66,0	36,00	14,25	7,50	4,50	190
	ap.	2,75	5,25	42,00	77,00	52,50	36,75	19,50	9,00	244

L'examen du tableau montre, par rapport au témoin, un effet de stimulation nette dans les 2 groupes traités. Toutefois, cette stimulation n'est pas compa-

rable à l'intensité de celle notée avec le B.C.G. ou la mycobactérie S.A.P.C. qui provoquent des transformations importantes de la synthèse des euglobulines.

C. — Stimulation des cellules spléniques et hépatiques

1° Rate. — Deux lots de 5 souris Swiss de 18 à 20 g sont injectés par voie I.P. :

a) 1 ml de liquide de Ringer.

b) 1 ml d'antigène à 1 mg/ml.

Vingt-quatre heures plus tard, les souris sont sacrifiées par strangulation. Les rates sont prélevées, puis broyées avec 10 ml de liquide de Ringer. La suspension est filtrée sur laine de verre stérile.

3 lots de 20 souris Swiss de 18 à 20 g sont alors injectés par voie I.P. avec :

a) 0,5 ml Ringer;

b) 0,5 ml de la suspension de rate témoin (1/4 de rate par souris);

c) 0,5 ml de la suspension de rate d'animaux traités par l'antigène somatique.

24 heures après l'injection préparatoire, tous les animaux sont inoculés par voie I.P. avec 0,5 ml d'une suspension en eau physiologique d'*Escherichia coli* 111 B4 diluée au 1/3 dans les conditions habituelles. Les résultats sont reportés dans le tableau XXXIII.

TABLEAU XXXIII

(*)	Témoin Ringer	Témoin rate	Rate stimulée par l'antigène somatique
Escherichia coli 111 B4 au 1/3	17/20	16/20	11/20

(*) En dénominateur le nombre d'animaux par lot — en numérateur les animaux morts au 7e jour.

2° Foie. — Deux lots de 5 souris Swiss, de 18 à 20 g sont injectés par voie intrapéritonéale avec :

a) 1 ml liquide de Ringer;

b) 1 ml antigène somatique.

Vingt-quatre heures plus tard, les souris de chaque groupe sont sacrifiées par strangulation, les foies sont prélevés, les parenchymes hépatiques sont mélangés et broyés avec 20 ml de liquide de Ringer. Les suspensions sont filtrées sur laine de verre et injectées à raison de 1 ml par voie intrapéritonéale à des groupes de 20 souris. Un groupe reçoit les foies du lot *a*) et un groupe les foies du lot *b*) : un groupe témoin reçoit par voie intrapéritonéale 1 ml de liquide de Ringer.

Vingt-quatre heures plus tard, toutes les souris reçoivent par voie intrapéritonéale 0,5 ml d'une suspension d'*Escherichia coli* 111 B4 diluée au 1/3. Les résultats sont reportés dans le tableau XXXIV.

TABLEAU XXXIV

	Témoins liquide de Ringer	Témoins foie	Foies stimulés par antigène somatique
Escherichia coli 111 B4 au 1/3	19/20	18/20	6/20

L'administration de l'antigène somatique provoque donc une stimulation de cellules compétentes au niveau de la rate et du foie, activité objectivable après transfert de ces cellules sur un animal neuf.

Dans ce domaine nouveau de l'activité immunitaire non spécifique, il est vraisemblable qu'il existe des spectres d'activité particulière liés aux propriétés stimulantes de la substance envers tel ou tel type cellulaire particulier. L'effet immunitaire non spécifique dépend de l'animal, de son âge, de son espèce; la réponse à une substance déterminée est fonction de la dose utilisée de la voie d'administration, et des conditions d'épreuve. Selon le niveau, cet effet conditionne la défense envers tel ou tel type d'agression. Pour cette raison, certaines substances douées de propriétés immunologiques non spécifiques sont plus actives, soit envers les infections virales, soit envers les infections microbiennes, soit envers les infestations parasitaires, soit envers l'envahissement tumoral.

DISCUSSION

L'antigène somatique du *Bacillus subtilis* possède en commun avec d'autres substances la propriété de stimuler l'immunité non spécifique. En effet, cette propriété a déjà été décrite pour le B.C.G., les endotoxines microbiennes, diverses fractions isolées de bactéries gram négatives, le vaccin pertussis, un extrait de Corynebactérie anaérobie, des hormones, des corps chimiques simples, tel le phénol ou la procaïne, etc.

Nous avons étudié comparativement certaines des propriétés des endotoxines avec celles de l'antigène somatique du *Bacillus subtilis* L.

Nous avons effectué nos essais avec de l'endotoxine extraite de la souche d'*Escherichia coli* 111 B4 par la méthode de O. Westphal (1). Cette endotoxine manifeste une activité immunologique non spécifique envers l'infection expérimentale que nous utilisons.

En revanche, des différences importantes existent entre l'antigène somatique et les endotoxines. En effet, les endotoxines proviennent de souches qui présentent une virulence ou une toxicité expérimentale, alors que l'antigène somatique est extrait d'une souche de *Bacillus subtilis* non pathogène. Les endotoxines sont solubles dans la phase aqueuse de l'extraction de Westphal, tandis que l'antigène somatique

TABLEAU XXXV

	B.C.G.	Vaccin pertusis	Endotoxines	Extrait Wxb 3148	Antigène somatique B
Origine	Mycobactérie bovine atténuée	H. pertussis	Bactéries gram négatives	Corynebactérie anaérobie	Souche de *Bacillus subtilis* L (gram positif)
Constitution	Très complexe	Complexe	Lipo-polysaccharide	Lipo-polysaccharide	Glycoprotéine
Solubilité dans l'eau	Particulaire	Soluble	Soluble	Insoluble	Insoluble
Solubilité dans les solvants des lipides	Certaines fractions	Certaines fractions	0	?	0
Solubilité dans le phénol	Certaines fractions	?	0	0	+
Extraction méthode de Boivin ou de Westphal	0	++	+++	?	0
Toxicité	Faible	++	++++	Faible	Presque nulle
Antigénicité	+	+	+	?	+
Schwartzmann local	0	+++	+++	0	0
Sensibilisation retardée	++	0	0	0	0
Action leucopéniante	0	+	+	+	0
Propriétés adjuvantes	++	++	+	0	Très faibles $\neq 0$
Stimulation des fonctions du SRE.	++	++	++	++++	Faible
Hyperplasie SRE	++	?	++	++++ (foie-rate)	0
Propriétés immunitaires non spécifiques	++	++	++	++	+++
Propriétés anti-inflammatoires	0	?	++	?	+++
Activité anti-tumorale	++	±	+	++	±
Modification de « tolérance » aux endotoxines	Sensibilisé	Sensibilise aux endotoxines +++	+++	Sensibilisé faiblement	0
Activité par voie injectable	+	+	+	+	+
Action le sur bronchospasme histaminique	?	+	+	?	0
Action sur l'animal surrénalectomisé	Peu d'augmentation de toxicité	Augmentation de toxicité +++	Augmentation de toxicité +++	?	Pas de modification de toxicité
Action sur l'hémodynamique	0	+	Activité type histaminique effet choc	0	0

est soluble dans le phénol. Sur le plan expérimental, les endotoxines induisent la « tolérance » chez l'animal adulte envers l'endotoxine, tandis que l'antigène somatique ne présente pas cette propriété.

Par ailleurs, les travaux de Bonilla-Soto ont objectivé l'activité de l'endotoxine d'*Escherichia coli* 111 B4 envers le bronchospasme provoqué par un aérosol d'histamine chez le cobaye. En utilisant le protocole expérimental proposé par cet auteur, nous avons comparé l'activité de l'endotoxine d'*Escherichia coli* 111 B4 avec celle de l'antigène somatique. Ces travaux, qui seront rapportés séparément, ont confirmé l'action inhibitrice du bronchospasme histaminique du cobaye par l'endotoxine tandis que l'antigène somatique de *Bacillus* ne montre pas d'activité expérimentale dans ces mêmes conditions. Il est également bien connu que la surrénalectomie augmente considérablement la toxicité des endotoxines, or l'administration d'antigène somatique à des animaux surrénalectomisés n'entraîne aucune modification de sa toxicité. En dernier lieu, il est classique que les endotoxines à forte dose modifient l'hémodynamique. Aussi, avons nous fait effectuer une étude pharmacologique de l'antigène de *Bacillus* sur l'appareil cardio-vasculaire. Cette étude, effectuée par R. Thévenot (*), n'a montré chez le chat, le lapin et le chien, aucune action cardio-vasculaire de l'antigène par voie parentérale à des doses /kg très supérieures à celles où celui-ci exerce son activité immunitaire.

L'ensemble de ces propriétés permet donc, de façon certaine, de distinguer le mode d'action de l'antigène somatique de celui des endotoxines.

L'antigène somatique de *Bacillus* se différencie aussi de l'extrait de *Corynebacteriæ* Wxb 3148 par le fait qu'il ne produit pas d'hyperplasie du foie et de la rate.

Nous avons dressé un tableau récapitulatif des propriétés connues de quelques-unes des substances qui possèdent en commun la propriété de stimuler certains des mécanismes immunitaires de façon non spécifique. Il apparaît nettement que cette activité commune expérimentale relève de mécanismes sans aucun doute différents, ce qui fait apparaître une certaine spécificité d'action dans cette stimulation dite non spécifique (tableau XXXV).

Il est très vraisemblable que, d'ici quelques années, ces substances seront dénommées par le mode de stimulation qu'elles provoquent, soit : stimulant lymphocytaire; stimulant histiocytaire; stimulant macrophagique; stimulant phagocytaire, envers tel type de particules ou tel type de micro-organismes ou de cellules; modificateur de tolérance envers tel groupe d'antigènes, etc.

Dès à présent, nous pensons qu'il faut éliminer le terme trop vague d'immunité non-spécifique pour employer le terme de stimulant immunitaire, dans l'attente de pouvoir préciser le type exact et le niveau cellulaire de cette stimulation.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Dans ce travail sont rapportées les études effectuées sur un antigène somatique isolé d'une souche de *Bacillus subtilis*.

1° La souche utilisée, qui possède un équipement antigénique propre, ne présente

(*) École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

ni virulence ni toxicité envers les rongeurs de laboratoire : souris, rats, cobayes, lapins.

2° Un antigène somatique en a été isolé. D'une grande thermostabilité, il est résistant à l'alcool, l'acétone, l'éther, le formol, les acides dilués. Il est altéré par les acides et détruit par les alcalins.

3° L'antigène est insoluble dans les solvants des lipides, peu soluble dans l'eau, soluble dans le phénol, non précipitable par l'acide perchlorique, précipitable par l'acide phosphotungstique. Il s'agit d'une glycoprotéine de haut poids moléculaire.

4° Cet antigène possède une toxicité extrêmement faible (la L.D. 50 est d'environ 2 g/kg chez la souris). La toxicité chronique mesurée chez le lapin et le cobaye n'a montré aucune modification des courbes de poids par rapport au témoin. Il a été noté, chez le lapin une augmentation significative du nombre des lymphocytes.

5° L'antigène somatique ne provoque pas de sensibilisation anaphylactique; il ne donne pas lieu au phénomène de Schwartzmann local lorsqu'on l'utilise comme agent sensibilisant; il provoque une réaction faible, lorsqu'on l'emploie localement chez un animal préalablement sensibilisé avec une souche d'*Escherichia coli*. Il ne produit pas de sensibilisation de type retardé chez le cobaye tuberculeux et ne provoque pas lui-même de sensibilisation de ce type. Il n'est pas, d'autre part, un antigène de Forssman.

6° Cet antigène montre une activité immunitaire non spécifique très importante. Dans ce travail, l'accent a été mis sur l'activité de protection non spécifique chez la souris envers des infections provoquées par diverses souches microbiennes gram positives et gram négatives et, plus particulièrement, envers l'infection provoquée par une souche d'*Escherichia coli* 111 B4. Il existe une relation dose-effet, objectivée par les modifications de la D.L. 50 dans les groupes de souris témoins et les groupes de souris traitées. La dose 50 p. 100 protectrice pour l'ensemble des lots traités a été établie.

L'activité immunitaire non spécifique se développe dès la 4e heure à partir de l'injection, passe par un maximum à la 24e heure et s'annule le 4e jour. Cette activité immunitaire non spécifique peut être suscitée de nouveau chez des animaux préalablement traités sans modification de la seconde réponse par rapport à la première. L'activité de l'antigène est pratiquement identique, quelle que soit la voie parentérale d'introduction mais elle est très faible par voie orale.

L'effet immunitaire non spécifique est plus net en ce qui concerne les entérobactéries et plus particulièrement les *Escherichia*, qu'envers les bactéries gram positives telles le staphylocoque ou le streptocoque. Un effet de protection a été également noté envers la toxine staphylococcique.

7° L'activité immunitaire non spécifique est bien due à l'antigène somatique lui-même. Toute modification de l'activité antigénique spécifique entraîne une disparition de l'activité immunitaire non-spécifique.

8° Chez des animaux en cours d'immunisation anti-virale (souris C 57 Bl 6, injectées avec un vaccin anti-aphteux du commerce), le traitement par voie intrapéritonéale au moyen de l'antigène somatique de *Bacillus* montre un accroissement significatif de la résistance des animaux traités envers l'inoculation d'épreuve, se

traduisant par un pourcentage de 50 p. 100 plus élevé de survivants dans le lot traité avec l'antigène somatique, par rapport au lot traité par le vaccin seul.

9° L'antigène possède une légère action envers le sarcome d'Ehrlich chez la souris, mais n'a montré aucune activité envers les tumeurs P 815, T 26-33, greffées sur la souris, ni contre les tumeurs T 8 et T 58 greffées sur le rat. Par ailleurs, l'antigène présente une très importante activité anti-inflammatoire, qui a été rapportée dans un travail séparé.

10° En ce qui concerne le mode d'action de cet antigène somatique, il est montré que son activité est due ni à un pouvoir antibiotique direct ou indirect envers les germes pathogènes utilisés, ni à la formation d'anticorps croisés, ni à une stimulation de la formation d'anticorps spécifiques envers les antigènes des germes pathogènes utilisés, ni à une modification de la tolérance immunitaire, ni à un effet anamnestique, ni à une action envers le complément, ni à un changement du pouvoir opsonisant ou du pouvoir bactéricide du sérum. L'antigène somatique se comporte comme un facteur protecteur envers l'effet leucopéniant des bactéries gram négatives chez la souris et maintient dans ces conditions le pouvoir anti-végétatif. Son rôle immunitaire non spécifique n'est pas lié à une stimulation quantitative lymphocytaire mais s'exerce par le truchement d'une stimulation du système lympho-réticulaire.

11° Les propriétés de l'antigène somatique du *Bacillus subtilis* ont été comparées à celles du B.C.G., du vaccin *Pertussis*, des endotoxines des bactéries gram négatives et de l'extrait de Corynebactérie anaerobie Wxb 3148. Ces diverses substances possèdent, en effet, en commun la propriété de stimuler des mécanismes immunitaires.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Landy (M.) et Braun (W.). — *Bacterial endotoxins*, The Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, U.S.A., 1964.
(2) Biozzi (G.), Halpern (B.) et Stiffel (C.). — in (24).
(3) Biserte (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, **39**, 149.
(4) Bonilla-Soto (O.). — *J. Allergy*, 1965, **5-6**, 250.
(5) Chedid (L.), Rudali (G.), Boyer (F.) et Parant (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1958, **247**, 2501-2504.
(6) Deprez (F.). — *Thèse Médecine*, Paris 1966.
(7) Dubos (R.J.) et Schaedler (R.W.). — *J. Exper. Med.*, 1956, **104**, 67.
(8) Dumas (J.). — *Bactériologie médicale*, Éd. Méd. *Flammarion*, Paris 1951.
(9) Gray (A.R.). — *J. Gen Microbiol.*, 1965, **41**, 195.
(10) Lallouette (P.) et Bourderon (G.). — *Rev. Imm.*, 1961, **25**, 1-22.
(11) Lallouette (P.).— *Thèse Médecine*, Paris 1953.
(12) Lallouette (P.) et Bourderon (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, **11**, 1470-1486.
(13) Lallouette (P.) et Bourderon (G.). — *Rec. Méd. Vét.*, 1959, **135**, 807-820.
(14) Lallouette (P.), Bourderon (G.) et Engel (M.). — *Rev. Imm.*, 1964, **28**, 237-249.
(15) Lallouette (P.), Richou (R.), Mmes Mantel (N.) et Schwartz (A.). — *Rev. Imm.*, 1964, **28**, 293-309.
(16) Lallouette (P.), Richou (R.), Mmes Schwartz (A.) et Richou (H.). — *Rev. Imm.*, 1968, **32**, 151.
(17) Lallouette (P.) et Mme Schwartz (A.). — *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1967, **264**, 683-685.
(18) Loiseleur (J.). — *Techniques de laboratoire*, Édit. Paris *Masson et Cie*, 1954.
(19) Pautrizel (R.), Dargelos (R.), Duret (J.) et Morijans (L.). — *Rev. Imm.*, 1961, **25**, 149.
(20) Pautrizel (R.), Dargelos (R.) et Laflaquière (F.). — *Rev. Imm.*, 1961, **25**, 74.
(21) Richou (R.) et Lallouette (P.). — *Rev. Imm.*, 1966, **30**, 317-328.
(22) Richou (R.), Lallouette (P.) et Quinchon (Cl). — *Rev. Imm.*, 1964, **28**, 173-183 et 343-348.
(23) Richou (R.), Lallouette (P.), Mmes Richou (H.) et Mantel (N). — *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1964, **259**, 3895-3897.
(24) *Rôle du S.R.E. dans l'immunité antibactérienne et antitumorale*, *Édition du C.N.R.S.*, 1963.
(25) Soltys (M.A.). — *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1963, **28**, 573.